

**Untersuchungen zum Einfluss von verschiedenen Chitosanen auf
Staphylococcus aureus und *Escherichia coli* mit Hilfe eines
Mikroplattennephelometers**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Felix Kehr
geboren am 18. Februar 1981 in Erfurt

18. Juli 2007

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Peter Elsner, Jena
2. Prof. Dr. med. Wolfgang Pfister, Jena
3. Prof. Dr. med. Pietro Nenoff, Mölbis

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.06.2008

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	(eng.) American Type Culture Collection
Ba ²⁺	Bariumionen
BaSO ₄	Bariumsulfat
CSF	(eng.) colony stimulating factor, koloniestimulierender Faktor
CRP	C-reaktives Protein
Da / kDa	Dalton / Kilodalton
DAEC	diffus adhärenzte <i>Escherichia coli</i>
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAEC	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ETEC	enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HDL	(eng.) high density lipoproteins, Lipoproteine mit hoher Dichte
HNO ₃	Salpetersäure
IL-1	Interleukin-1
KBE	koloniebildende Einheiten
Kon mit	Kontrolle mit Puffer (PBS), Referenzkontrolle
Kon ohne	Kontrolle ohne Puffer
mPa x s	Millipascal mal Sekunde
M	molar, mol/L
McF	Mc Farland
MG	Molekulargewicht
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MRSA	methicillinresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NPN	1-N-phenylnaphthylamine
-NH ₂	Aminogruppe
-NH ₃ ⁺	protonierte Aminogruppe

PBS	(<i>eng.</i>) Phosphate Buffered Saline, Phosphatpuffer
pH-Wert	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pK-Wert	negativ dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstanten (Säurekonstanten)
ppm	(<i>eng.</i>) parts per million
SDS	(<i>eng.</i>) Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodezylsulfat
SSSS	(<i>eng.</i>) Staphylococcal-Scaled-Skin-Syndrom
TSS	(<i>eng.</i>) Toxic-Shock-Syndrom
Zn ²⁺	Zinkionen

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Chitosan.....	3
2.2 Bakterienstämme	7
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	8
2.3 Nephelometrie	10
3 Ziele der Arbeit	12
4 Material und Methoden	13
4.1 Chemikalien	13
4.2 Geräte und Materialien.....	13
4.3 Software	14
4.4 Chitosane	14
4.4.1 Chitosan 1130.....	14
4.4.2 Chitosan-HCl.....	15
4.4.3 Chitosan 85/15/A1.....	16
4.4.4 Chitosan-oligosaccharid-lactat (Oligomer)	16
4.4.5 N-Acetyl-D-Glucosamin	17
4.5 Verwendete Bakterienstämme und Bakterienanzucht.....	18
4.6 Vorversuche	19
4.6.1 Keimzahlbestimmung.....	19
4.6.2 Standardkurven.....	20
4.6.3 Wachstumskurven ohne Chitosan	21
4.7 Erstellen der Wachstumskurven mit Chitosan am Nephelometer.....	22
4.7.1 Lösen und Verdünnen der Chitosane	22
4.7.2 Herstellung der Bakteriensuspension und Einstellen der Ausgangskeimzahl.....	23
4.7.3 Beschreibung der befüllten Mikrotiterplatten	23
4.7.4 Messung im Nephelometer.....	25
4.7.5 pH-Messung	26
4.7.6 Überimpfen der Bakteriensuspension auf Agarplatten	26
4.8 Mathematische Auswertung der Messwerte	27

5 Ergebnisse	28
5.1 Identifikation von <i>Staphylococcus aureus</i> mit ID 32 Staph.....	28
5.2 Keimzahlbestimmung.....	28
5.3 Standardkurven.....	29
5.4 Wachstumskurven ohne Chitosan	30
5.5 Ergebnisse der Messreihen mit Chitosan	32
5.6 Wirkung von Chitosan 1130	32
5.7 Wirkung von Chitosan-HCl	37
5.8 Wirkung von Chitosan 85/15/A1	41
5.9 Wirkung von Chitosan-oligosaccharid-lactat.....	47
5.10 Wirkung von N-Acetyl-D-Glucosamin	51
5.11 pH-Messung	55
5.12 Bakterienanzucht nach den Messungen	56
5.13 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse	57
6 Diskussion	59
6.1 Die antibakterielle Wirkung von Chitosanen in Abhängigkeit von der Molekularstruktur und abiotischen Faktoren	59
6.2 Wirkungsmechanismus von Chitosanen	63
6.3 Einsatz der Lasernephelometrie zum Wachstumsmonitoring von Mikroorganismen	66
7 Schlussfolgerungen	68
8 Literaturverzeichnis.....	70
9 Anhang	76
9.1 Abbildungsverzeichnis.....	76
9.2 Tabellenverzeichnis.....	79
9.3 Arbeitsanweisung Bakterienanzucht	82
9.4 Arbeitsanweisung Keimzahlbestimmung bei Bakterien	83
Lebenslauf	I
Danksagung.....	II
Ehrenwörtliche Erklärung	III

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von verschiedenen Chitosanen auf *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia coli* ATCC 35218 in vitro untersucht. Chitosane werden durch partielle Deacetylierung des Polysaccharids Chitin hergestellt, sie werden durch ihr Molekulargewicht (MG) und ihren Deacetylierungsgrad charakterisiert. Diese Biopolymere besitzen antibakterielle Eigenschaften, die jedoch in Abhängigkeit von der Molekularstruktur unterschiedlich stark ausfallen können. Der exakte Mechanismus der antibakteriellen Wirkung ist bisher noch nicht bekannt.

In dieser Studie wurden fünf Substanzen mit unterschiedlichen Molekulargewicht verwendet: Chitosan 1130 (MG: 120 kDa), Chitosan-HCl (MG: 30 kDa), Chitosan 85/15/A1 (MG: 30-50 kDa), Chitosan-oligosaccharid-lactat (MG: 5kDa) und N-Acetyl-D-Glucosamin (MG: 221,21Da). Der Deacetylierungsgrad von Chitosan 1130, Chitosan-HCl und Chitosan 85/15/A1 lag zwischen 85 % und 87 %. Das Oligomer (Chitosan-oligosaccharid-lactat) erreichte Werte größer 90 %, das Monomer von Chitin (N-Acetyl-D-Glucosamin) war vollständig acetyliert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die antibakteriellen Eigenschaften der verwendeten Chitosane in vitro untersucht und ein möglicher Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und biologischer Aktivität dargestellt werden. Die Chitosankonzentrationen, die das Wachstum der Bakterienstämme beeinflussen, sollten ermittelt werden.

Die Messungen wurden mit Hilfe eines Lasernephelometers auf der Basis von Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Nephelometrie ist ein quantitativ analytisches Verfahren, welches zur Bestimmung der Trübung von Flüssigkeiten und Gasen verwendet werden kann. Die Nephelometrie findet in der klinischen Chemie häufig Verwendung, im Bereich des Wachstumsmonitoring von Mikroorganismen wird sie hingegen selten genutzt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einsatz des Mikroplattenephelometers bewertet werden.

Mit Hilfe des Mikroplattenephelometers wurde stündlich die Trübung der verschiedenen Bakteriensuspensionen bestimmt, eine Messreihe dauerte 20 Stunden. Werte aus Mehrfachbestimmungen (16 Einzelwerte pro Konzentration) wurden gemittelt und graphisch dargestellt. Die Signifikanz zur entsprechenden Referenzkontrolle wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests bestimmt.

Chitosan 1130, die Substanz mit dem höchsten Molekulargewicht, erzielte die stärkste Wachstumshemmung von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia coli* ATCC 35218. Chitosan-HCl zeigte eine geringfügig schwächere Wirkung. Für beide

Substanzen konnte ein bakterizider Effekt auf die verwendeten Bakterienstämme nachgewiesen werden.

Chitosan 85/15/A1 zeigte ebenfalls eine deutliche Wachstumshemmung in der nephelometrischen Untersuchung. Die Substanz war in den verwendeten Konzentrationen jedoch nicht in der Lage eine vollständige Abtötung der Bakterien zu erzielen.

Das Oligomer (Chitosan-oligosaccharid-lactat) verursachte nur eine geringe Wachstumshemmung von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia coli* ATCC 35218. N-Acetyl-D-Glucosamin blieb fast wirkungslos, die Substanz konnte keine nennenswerte Hemmung der verwendeten Bakterien erzielen.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 und *Escherichia coli* ATCC 35218 zeigten eine ähnliche Empfindlichkeit gegen die verwendeten Chitosanderivate. Die antibakterielle Wirkung der verwendeten Substanzen war abhängig vom jeweiligen Molekulargewicht.

Der Wirkungsmechanismus von Chitosanen ist bis jetzt noch nicht endgültig aufgeklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich mit der Literatur lassen auf einen unspezifischen Mechanismus schließen. Theoretische Ansätze wurden diskutiert und dargestellt.

2 Einleitung

2.1 Chitosan

Chitosan ist ein heterogenes Polymer aus 2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranose (Acetylglucosamin) und 2-Amino-2-desoxy- β -D-glucopyranose (Glucosamin), welche durch β -1,4 glycosidische Bindungen verknüpft sind. Hierbei überwiegt der Anteil des Glucosamins im Gesamtmolekül.

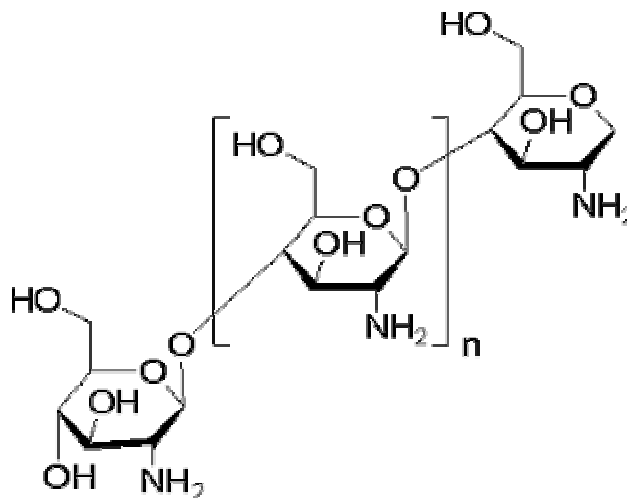


Abbildung 2.1: Strukturformel von Chitosan

Chitosan wird durch partielle Deacetylierung des Polysaccharids Chitin gewonnen (siehe Abbildung 2.2). Nach Cellulose ist Chitin das zweithäufigste Biopolymer (Lim und Hudson 2004). Es besteht aus β -1,4 glycosidisch gebunden Acetylglucosamin. Es ist in der Natur sehr weit verbreitet und kommt zum Beispiel im Außenskelett der Gliederfüßer, Zellwänden von Pilzen und Garnelenschalen vor (Wintermantel und Ha 2002). Für die industrielle Herstellung von Chitosan werden hauptsächlich Schalenabfälle von Krebstieren, deren Chitingehalt bis zu 70 % betragen kann, verwendet (Felt et al. 1998).

Der erste Schritt der Chitosanherstellung umfasst die Zerkleinerung der Schalen und die Deproteinierung. Anschließend wird mit verdünnter HCl-Lösung das enthaltene Calciumcarbonat entfernt. Nach diesem Demineralisationsprozess und Entfärbung des erhaltenen Chitins folgt die Deacetylierung durch konzentrierte NaOH-Lösung (Wintermantel und Ha 2002).

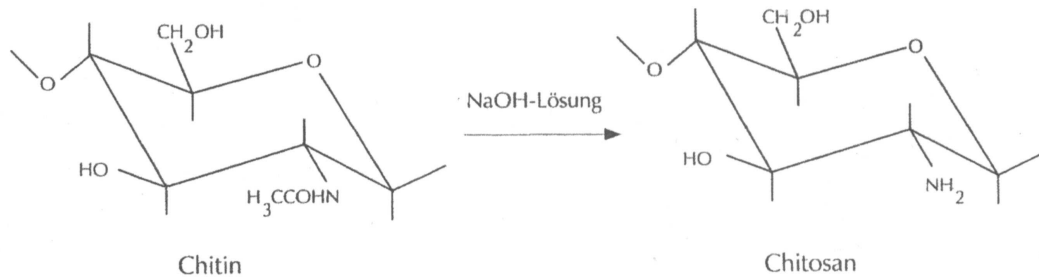


Abbildung 2.2: Deacetylierung von Chitin zu Chitosan

Chitosan wird durch das Molekulargewicht und den Deacetylierungsgrad charakterisiert.

Hierbei liegt das Molekulargewicht der meisten handelsüblichen Chitosane über 50000 Da (Illum 1998). Jedoch sind auch Chitosane mit kleineren Molekülgrößen und Oligomere (Chitosanoligosaccharide) herstellbar. Diese können durch enzymatische Hydrolyse von Chitosan gewonnen werden (Tsai et al. 2000 und 2004).

Der Deacetylierungsgrad umschreibt den Anteil von 2-Amino-2-desoxy- β -D-glucopyranose-Einheiten im Molekül. Er liegt bei handelsüblichen Chitosanen zwischen 70 und 95 % (Ph Eur 2005).

Chitosan ist in den meisten verdünnten organischen Säuren (Ameisen-, Essig-, Milch- oder Zitronensäure) sowie einigen anorganischen Säuren (HCl, HNO₃) gut löslich (Singla und Chawla 2001). Im Gegensatz hierzu ist Chitin sowohl in wässrigen Lösungen als auch in organischen Säuren unlöslich (Wintermantel und Ha 2002). Somit lässt sich die gute Löslichkeit von Chitosan durch die vorhandenen protonierbaren Aminogruppen der Glucosamineinheiten erklären. Das Molekül zeigt in Lösung ein polykationisches Verhalten. Aufgrund der guten Löslichkeit können durch einfache Verarbeitungsschritte verschiedenste Materialformen, zum Beispiel Salben, Pulver, Fasern oder Membranen hergestellt werden.

Das wissenschaftliche Interesse an Chitosan ist in den letzten Jahren stark gewachsen. Die in vielfältigen Richtungen durchgeführten Forschungsarbeiten zeigen das Potential von Chitinderivaten in unterschiedlichsten Bereichen. Im Folgenden sollen kurz wesentliche Eigenschaften und Untersuchungen dargestellt werden.

Chitosan ist als Polykation in der Lage als Komplexbildner mit vielen negativ geladenen Substanzen wie Farbstoffen, Proteinen und DNA zu reagieren. Mit Schwermetallionen bildet es schwerlösliche Chelatkomplexe und kann somit zur Abwasseraufbereitung eingesetzt

werden (Hirano 1996). Auch ist in diesem Zusammenhang zu nennen, dass Chitosan als Flockungsmittel Bakterien binden kann (Strand et al. 2001).

Mehrere Autoren bestätigen die hohe Biokompatibilität von Chitinderivaten (Chandy und Sharma 1990, Rao und Sharma 1997).

Tanaka et al. (1997) empfehlen hingegen einen vorsichtigen Umgang bei der klinischen Verwendung von Chitosan über einen längeren Zeitraum. Nach der oralen und parenteralen Langzeitgabe von Chitin und Chitosan an Mäusen wurden sowohl klinisch eine Abnahme des Körpergewichts, sowie eine Vielzahl von Makrophagenhyperplasien in der histologischen Untersuchung gefunden. Im Körper wird Chitosan durch Lysozym zu N-Acetylglucosamin abgebaut, welches dann in den Syntheseweg von Glycoproteinen eingebunden wird (Muzzarelli 1997).

Mehrere Arbeiten beschäftigten sich mit dem Potential von Chitosan, Wundheilungsprozesse zu beeinflussen. Howling et al. (2001) untersuchten den Einfluss von Chitinderivaten auf Fibroblasten und Keratinozyten in vitro. Während die Proliferation von Fibroblasten gefördert wurde, zeigten sich wachstumshemmende Wirkungen auf Keratinozyten. Hierbei erzielten Chitosane mit hohem Acetylierungsgrad stärkere Effekte. Die beschriebenen Wirkungen setzten die Anwesenheit von Serum in den Proben voraus, eine Wechselwirkung mit Wachstumsfaktoren wird daher angenommen. Im Gegensatz hierzu fanden Mori et al. (1997) wachstumshemmende Wirkungen auf Fibroblasten in vitro, jedoch wurde die Bildung von Interleukin-8 induziert. Dies könnte zu einer Proliferationsförderung von Zellen in vivo führen. Chitosan führt zur Makrophagenaktivierung, Stimulierung der Angiogenese (Muzzarelli 1997) und Freisetzung von Kollagenase durch Fibroblasten (Okamura et al. 2005). Wundheilungsprozesse können hierdurch beschleunigt werden. Zusätzlich kann bei der Wundbehandlung die von der normalen Gerinnungskaskade unabhängige hämostatische Wirkung der Chitosane genutzt werden (Rao und Sharma 1997).

Chitinderivate können die Aufnahme von anderen Arzneistoffen verbessern. Illum et al. (1994) berichteten, dass Chitosan die nasale Absorption von Insulin erhöht. Auch kann die intestinale Aufnahme von Peptiden gesteigert werden (Luessen et al. 1996). Insbesondere Chitosane mit einem hohen Deacetylierungsgrad können die Penetration von schlecht aufnehmbaren Stoffen erhöhen (Schipper et al. 1996), was auf eine Öffnung von Tight Junctions zurückzuführen ist (Dodane et al. 1999).

Ebenfalls sind Chitosane in der Lage das unspezifische Immunsystem zu stimulieren und so zum Beispiel eine Abwehr von Infektionen zu verbessern (Iida et al. 1987, Nishimura et al. 1985 und 1986). Es werden Makrophagen aktiviert und die Produktion von

Cytokinen (IL-1, CSF) und Interferonen induziert. Auch kann die Bildung von zytotoxischen T-Zellen gefördert werden. Chitosan führt somit zu einer allgemeinen, unspezifischen Immunantwort und unterstreicht damit seine Eignung als mögliches Adjuvans in der Immuntherapie.

Maezaki et al. (1993) beobachteten, dass Chitosan nach oraler Gabe Einfluss auf den Cholesterinspiegel nehmen kann. So zeigte sich eine Verminderung des Gesamtcholesterins im Serum, bei gleichzeitigem Anstieg der HDL-Konzentration. Auch war die Exkretion von Gallensäuren bei den Probanden erhöht, da die Rückresorption durch Bindung an Chitosan verhindert wurde. Eine Verwendung im Kampf gegen Hypercholesterinämie und Arteriosklerose wäre in der Zukunft denkbar.

Eine weitere wesentliche Eigenschaft von Chitosanen ist deren antimikrobieller Charakter. So wurden hemmende Wirkungen auf verschiedenste grampositive und gramnegative Bakterien sowie Pilze beschrieben (Rabea et al. 2003). Aufgrund der verschiedenen Molekülgrößen und Acetylierungsgrade der verwendeten Chitinderivate sowie unterschiedlicher Versuchsaufbauten ergeben sich jedoch teilweise gegensätzliche Ergebnisse. Zum Beispiel beobachteten Chung et al. (2004) eine stärkere Wirkung auf gramnegative Bakterien während No et al. (2002) eine bessere Wachstumshemmung von grampositiven Keimen beschrieben.

Alle Untersuchungen kamen dagegen einheitlich zu dem Ergebnis, dass die chemische Beschaffenheit der Chitosane, wie Deacetylierungsgrad und Polymerkettenlänge, eine wichtige Rolle im Hinblick auf deren biologische Aktivität spielt.

Auch ist der exakte Mechanismus der antibakteriellen Wirkung bisher unbekannt. Verschiedene Theorien existieren, Interaktionen mit Zellmembranen durch die polykationische Molekülstruktur sowie Bindung von Spurenelementen in Chelatkomplexen wären denkbar (Rabea et al. 2003). Zusätzlich kann, wie oben beschrieben, das unspezifische Immunsystem des infizierten Makroorganismus durch Chitosan aktiviert und somit die Abwehr von Erregern verbessert werden. Weitere wissenschaftliche Arbeiten sind auf diesem Gebiet nötig, um Chitosane für die Medizin nutzbar zu machen.

2.2 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurde *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* verwendet. Im Folgenden sollen beide Mikroorganismen kurz vorgestellt werden.

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus gehört der Familie der *Micrococcaceae* an, welche grampositive, überwiegend fakultativ anaerob wachsende, kugelförmige Bakterien umfasst (Peters und Pulverer 2001). Der Erreger ist zumeist in Haufen gelagert, unbeweglich und bildet keine Sporen. Da er sehr widerstandsfähig ist, kann er auf vielen künstlichen Nährböden angezüchtet werden. Hierbei bilden sich weiße bis gelbliche, runde Kolonien (siehe Abbildung 4.6). *Staphylococcus aureus* ist relativ resistent gegen Temperaturschwankungen, Austrocknung, pH-Schwankungen und verschiedenste Desinfektionsmittel (Peters und Pulverer 2001). Die Wachstumstemperatur hat ihr Optimum bei 37 °C (Hahn et al. 2005). Die Keime sind somit an Säugerorganismen adaptiert, können aber auch in einem anderen Milieu überdauern. *Staphylococcus aureus* kolonisiert bei einem Teil der Bevölkerung die Haut, insbesondere den vorderen Nasenvorhof, Achselhöhlen und Perinealregion. Medizinisches Personal ist hiervon besonders betroffen.

Die durch *Staphylococcus aureus* verursachten Erkrankungen können in pyogene invasive Prozesse, welche durch die Gesamtaktivität der Virulenzfaktoren bedingt sind, und Toxinvermittelte Erkrankungen eingeteilt werden (Peters und Pulverer 2001). Zu erstgenannten gehören sowohl lokal-oberflächliche Erkrankungen wie Wundinfektionen, Furunkel, Karbunkel und andere Pyodermien, als auch tiefe Prozesse wie Abszesse, Empyeme, eitrige Parotitis und Pneumonien. *Staphylococcus aureus* stellt einen der häufigsten Erreger bakterieller Entzündungen der Haut dar (Hofmann et al. 1995). Besonders bei Patienten mit schlechter Abwehrlage kann es zur Sepsis oder Endokarditis kommen. 30 % aller Sepsisfälle werden von *Staphylococcus aureus* hervorgerufen (Hahn et al. 2005). Bei den durch Toxine ausgelösten Erkrankungen ist der eigentliche Infektionsherd von untergeordneter Bedeutung. Entscheidend ist hier das produzierte Toxin, welches an anderer Stelle seine Wirkung entfaltet. Ein Beispiel hierfür ist die durch Enterotoxine ausgelöste Gastroenteritis. Aber auch schwerwiegende Erkrankungen wie Staphylococcal-Scaled-Skin-Syndrom (SSSS) und Toxic-Shock-Syndrom (TSS) können dieser Gruppe zugeordnet werden. Einen Überblick über verschiedene wichtige Virulenzfaktoren gibt Tabelle 2.1.

Staphylococcus aureus ist in der Lage Resistenzen gegen Antibiotika zu bilden, welche von Resistenz-Plasmiden gesteuert werden. Ca. 80 % aller Stämme sind resistent gegen Penicillin

(Peters und Pulverer 2001). Auch treten immer häufiger methicillinresistente Stämme (MRSA) auf, bei denen sämtliche β -Laktame wirkungslos sind. Die Therapie von Infektionen mit Beteiligung von MRSA ist somit schwierig und gelingt nur unter dem Einsatz von Reserveantibiotika wie z.B. Vancomycin.

Tabelle 2.1: Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus*

Virulenzfaktor	pathologische Bedeutung
Kapsel aus Polysacchariden	Behinderung der Phagozytose
Protein A	Bindung an Fc-Fragmente von Immunglobulinen
Clumping Factor	Rezeptor für Fibrinogen, Bindung an Fibrinogen
Koagulase	Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin, Bildung von Fibrinschutzwall
Staphylokinase	Bildung von Plasmin, Ausbreitung der Erreger
Hyaluronidase, Lipasen, Nukleasen	Spaltung entsprechender Substrate, Ausbreitung der Erreger
Hämolysine	Zerstörung von Erythrozyten und anderen Zellen
Leukozidin	Zerstörung von Granulozyten und Makrophagen
Enterotoxine	verursachen Durchfälle und Erbrechen
Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1	Aktivierung von CD4-T-Zellen, verursacht TSS
Exfoliatine	verursacht SSSS

2.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli gehört der Familie der Enterobakterien an, welche verschiedene gram-negative Stäbchen umfasst. Die Vertreter dieser Gruppe zeichnen sich durch ihren fakultativ anaeroben Stoffwechsel aus und sind in der Lage Glucose oxidativ als auch fermentativ zu spalten (Hahn und Bockemühl 2005). *Escherichia coli* gehört zur physiologischen Darmflora, sein Nachweis in Lebensmitteln oder Wasser dient als Indikator für fäkale Verunreinigung. Der Keim ist sehr widerstandsfähig gegen oberflächenaktive Substanzen, beweglich und bildet keine Sporen. Sein Wachstumsbereich liegt zwischen 4 und 46 °C. In der Forschung stellt *Escherichia coli* das meistbenutzte Bakterium dar (Hahn und Bockemühl 2005).

Das Bakterium gehört zu den fakultativen Krankheitserregern. Durch extraintestinale Kontamination kann es zu opportunistischen Infektionen kommen. *Escherichia coli* verursacht häufig Infektionen der Harnwege. Auch spielt der Keim häufig als Erreger der Sepsis eine Rolle, Abwehrschwäche oder Immunsuppression des Wirtes stellen hierbei prädisponierende Faktoren dar. In der Nachbarschaft des Darms kann es zur Cholezystitis, Cholangitis, Appendizitis oder Peritonitis kommen. Auch sind Wundinfektionen häufig. Bei

Kontamination von Neugeborenen unter der Geburt können sich Meningitis, Pneumonie oder septische Geschehen entwickeln. In Tabelle 2.2 werden wesentliche Virulenzfaktoren aufgeführt.

Tabelle 2.2: Virulenzfaktoren von *Escherichia coli*

Virulenzfaktor	pathologische Bedeutung
Kapsel aus Polysacchariden	Behinderung der Phagozytose
Lipopolysaccharide (Endotoxine)	Aktivierung des Komplementsystems, Induktion von Entzündungsfaktoren
Fimbrien (Adhäsine)	Anheftung an verschiedenen Oberflächen
Hämolysine	Zerstörung von Erythrozyten und anderen Zellen
β -Laktamasen	Resistenz gegen β -Laktam-Antibiotika

Neben den fakultativ pathogenen Stämmen gibt es auch obligat pathogene *Escherichia coli*. In den vergangenen Jahren konnten sechs verschiedene Typen phänotypisch und genotypisch differenziert werden (Heesemann 2001). Sie verursachen Diarrhoen, die je nach Virulenz des Erregers von sekretorischer bis blutig-schleimiger Art sein können. Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die verschieden obligat pathogenen Stämme.

Tabelle 2.3: obligat pathogene *Escherichia coli*

Stamm	Erkrankung
enteropathogene <i>Escherichia coli</i> (EPEC)	Säuglingsenteritis
enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> (EAEC)	persistierende Enteritis bei Kleinkindern
enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> (EIEC)	ruhrartige Enteritis
enterotoxische <i>Escherichia coli</i> (ETEC)	Reisediarrhoe, wässrige cholera-ähnliche Enteritis
enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i> (EHEC)	Colitis, hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS), thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
diffus adhärente <i>Escherichia coli</i> (DAEC)	wässrige Diarrhoe bei Kleinkindern

2.3 Nephelometrie

Die Nephelometrie ist ein quantitativ analytisches Verfahren, mit deren Hilfe die Trübung von Flüssigkeiten und Gasen bestimmt werden kann.

Sie ist von der Turbidimetrie zu unterscheiden. Bei dieser Methode wird in einem Photometer die Intensitätsminderung eines transmittierten Strahlenbündels, durch die in der zu analysierenden Lösung befindlichen Partikel, bestimmt (Haeckel und Schumann 1995).

Im Gegensatz zu diesem Vorgehen wird bei der Lasernephelometrie der direkte Lichtstrahl ausgeschaltet (Hipler et al. 2003). Von Interesse ist hier die Entstehung von Streulicht bei der Passage durch ein trübes Medium (Haeckel und Schumann 1995). Diese physikalischen Grundlagen der Lichtstreuung, auch als „Tyndall-Effekt“ benannt, wurden Ende des 19. Jahrhunderts von Michael Faraday und John Tyndall beschrieben. Viele alltägliche Phänomene beruhen auf diesen Erkenntnissen. So ist das Aussehen von Milch sowie die blaue Farbe des Himmels der Streuung von Licht an unterschiedlichen Partikeln geschuldet. Bei der Lasernephelometrie wird das nach vorn gestreute Licht durch Linsen auf einer Photodiode gesammelt und gemessen. Umso mehr Partikel in einem Analysat vorhanden sind, desto stärker wird das Licht beim Durchgang abgelenkt. Das Nephelometer misst entsprechend höhere Trübungen. Die erhaltenen Werte steigen somit proportional mit der Teilchendichte in der Probe an.

In der klinischen Chemie findet die Nephelometrie Anwendung zur Bestimmung von Proteinpräzipitaten und Antigen-Antikörper-Komplexen in flüssigem Medium (Döner 2001, Haeckel und Schumann 1995). So können z.B. Immunglobuline, CRP oder Albumin quantifiziert werden. In der organischen Chemie wird der Ablauf von Polymerisationsreaktionen nephelometrisch kontrolliert. Auch kann die Lasernephelometrie zur Bestimmung der Löslichkeit von Medikamenten genutzt werden (Bevan und Lloyd 2000). Eine bisher wenig genutzte Anwendungsmöglichkeit ist das Wachstumsmonitoring von Mikroorganismen. Fouda et al. (2006) untersuchten den Einfluss von β -Cyclodextrin-Komplexen mit fungiziden Econazol-Nitrat bzw. Ciclopirox-olamine auf *Candida albicans* und *Candida krusei* mit Hilfe dieser Methode. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Lasernephelometrie ein effizientes Verfahren darstellt, welches zum Monitoring von Wachstum verschiedenster Mikroorganismen genutzt werden kann. Ähnlich gute Ergebnisse erhielten Hipler et al. (2003), die Vergleichsmessungen im Photometer und im Nephelometer durchführten. Es zeigte sich, dass die Nephelometrie durchaus ebenbürtig erscheint. Hinsichtlich der Sensitivität ergaben sich sogar Vorteile, da bereits bei geringen

Partikelkonzentrationen, also in der Initialphase des Wachstums, Messwerte ermittelt werden konnten. Auch konnte eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen demonstriert werden.

In beiden Studien wurde ein Lasernephelometer auf der Basis von Mikrotiterplatten verwendet. Für diese Arbeit wurde ein identisches Gerät genutzt. Die Abbildungen 2.3 und 2.4 zeigen das verwendete Nephelometer „NEPHELOstar Galaxy“ mit einer 96 Well-Mikrotiterplatte sowie den Laser des Gerätes.

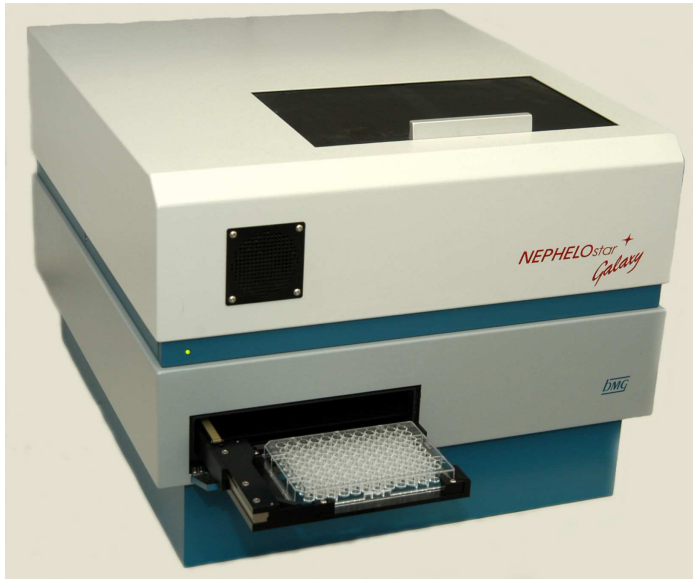


Abbildung 2.3: Mikroplattenephelometer „NEPHELOstar Galaxy“



Abbildung 2.4: Laser

3 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit ist Teil eines weiterreichenden Projektes der Klinik für Dermatologie und dermatologische Allergologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, welches die Aktivität unterschiedlicher Chitosanderivate auf verschiedene Bakterien, Pilze und Keratinozyten untersucht.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte der Einfluss von fünf verschiedenen Chitosanderivaten auf die Vermehrung von *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* bestimmt werden. Es wurden Chitosane mit unterschiedlichen Molekulargewichten verwendet. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und biologischer Aktivität sollte in vitro untersucht und die antibakteriellen Eigenschaften der Substanzen bewertet werden. Die Chitosankonzentrationen, die das Wachstum der Bakterienstämme beeinflussen, sollten ermittelt werden.

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe eines Mikroplattennephelometers durchgeführt. Die Lasernephelometrie ist in der klinischen Chemie als Analysemethode weit verbreitet. Im Bereich des Wachstumsmonitoring von Mikroorganismen findet diese Methode hingegen kaum Anwendung. Fouda et al. (2006) und Hipler et al. (2003) erzielten positive Ergebnisse beim Einsatz der Lasernephelometrie zum Monitoring von Wachstum verschiedener Mikroorganismen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einsatz des Mikroplattennephelometers bewertet werden.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien

API NaCl 0,85 % Medium	Fa. Biomerieux, Marcy-l'Etoile
Chitosan-HCL	Fa. Heppe, Queis
Chitosan 1130	Fa. ChiPro, Bremen
Chitosan-oligosaccharid-lactat (Chitosanoligomer)	Fa. SIGMA-Aldrich, St.Louis/ Steinheim
Chitosan 85/15/A1	Fa. Heppe, Queis
Essigsäure (Acetat)	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Glucose-Bouillion	Fa. Oxoid, Basingstoke
ID 32 Staph (System zur Identifizierung von Staphylokokken)	Fa. Biomérieux, Marcy-l'Etoile
Isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl)	Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg
Mc Farland-Standard (Standardreihe mit verschiedenen optischen Dichten)	Fa. Biomérieux, Marcy-l'Etoile
Mueller-Hinton Hypersale E-Test (Mueller-Hinton II Agar)	Fa. AES, Cedex
Mueller-Hinton Sang Mouton (Blutagar)	Fa. AES, Cedex
N-Acetyl-D-Glucosamin	Fa. SIGMA-Aldrich, St.Louis/ Steinheim
PBS-Tabletten (Phosphatpuffer)	Fa. SIGMA-Aldrich, St.Louis/ Steinheim
Universalindikator pH 0-14	Fa. Merck, Darmstadt

4.2 Geräte und Materialien

Biosafe eco (Brutschrank 37 °C)	Fa. Integra Bioscience, Vancouver
Breathe-Easy (Abdeckfolien für Mikrotiterplatten)	Fa. Diversified Biotech, Boston
Camedia C-5050 (Digitalkamera)	Fa. Olympus, Hamburg
Cell-Star PP-Test Tubes 15 mL (sterile Reagenzgläser aus Plastik)	Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen
Colony counter (Kolonienzählgerät)	Fa. BEL-ART Scienceware, Pequannock
Densimat (Gerät zur Bestimmung der Trübung von Suspensionen)	Fa. Biomérieux, Marcy-l'Etoile
Gefrierschrank (-80 °C)	Fa. Kendro, Hanau

Gefrierschrank (-20 °C)	Fa. Liebherr, Ochsenhausen
Glasflaschen (250 mL, 500 mL)	Fa. Schott, Jena
Handschuhe (nicht steril)	Fa. Kimberly-Clark, Roswell
Kühlschrank (7 °C)	Fa. Liebherr, Ochsenhausen
Mini-API (Identifikation von <i>Staphylococcus aureus</i>)	Fa. Biomérieux, Marcy-l'Etoile
Mehrkanalpipette	Fa. Eppendorf, Hamburg
Microbank (Gefäße zum Einfrieren von Bakterienstämmen)	Fa. Pro-Lab Diagnostics, Neston
Mini light box	Fa. BEL-ART Scienceware, Pequannock
Nalgene (sterile Filtration)	Fa. Nalge Nunc International, Rochester
NEPHELOstar Galaxy (Nephelometer)	Fa. BMG Labtechnologies, Offenburg
PS Mikrotiterplatte 96 Wells steril	Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipetten (verschiedene Größen)	Fa. Eppendorf, Hamburg
sterile Ösen (verschiedene Größen)	Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen
Varioklav (Autoklav)	Fa. H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Waage	Fa. Sartorius, Göttingen

4.3 Software

Microsoft Excel

NEPHELOstar Galaxy Version 4.30-0

SPSS 13.0

4.4 Chitosane

Es wurden fünf verschiedene Substanzen (Chitosan 1130, Chitosan-HCL, Chitosan 85/15/A1, Chitosan-oligosaccharid-lactat, N-Acetyl-D-Glucosamin) verwendet, deren Eigenschaften im Folgenden kurz beschrieben werden.

4.4.1 Chitosan 1130

Chitosan 1130 (Abbildung 4.1) wurde von der ChiPro GmbH bezogen. Es wurde in Form von weißen Plättchen geliefert. Nach Herstellerangaben beträgt das mittlere Molekulargewicht 120 kDa. In dieser Untersuchung war es das Polymer mit der größten Kettenlänge.

Chitosan 1130 ist wasserlöslich und hat einen Feuchtigkeitsgehalt von < 10 %. Der Deacetylierungsgrad beträgt 85,2 %, der Ascheanteil liegt unter 0,5 %. Die Substanz hat in

einer 1%-igen wässrigen Lösung eine Viskosität von 10-15 mPa x s und einen pH-Wert von 4.

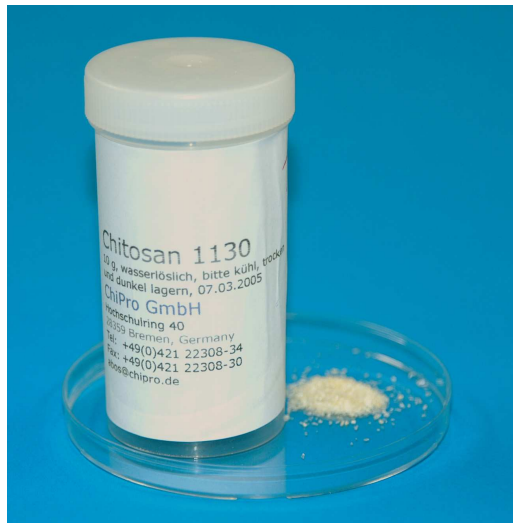


Abbildung 4.1: Chitosan 1130

4.4.2 Chitosan-HCl

Das verwendete Chitosan-HCl (Abbildung 4.2) wurde von der Heppe GmbH, in Form weißen Pulvers geliefert. Das mittlere Molekulargewicht liegt laut Herstellerangaben bei 30 kDa.

Die Substanz ist ebenfalls wasserlöslich. Der Feuchtigkeitsgehalt beträgt 5,5 %, der Ascheanteil liegt bei 0,1 %. Der Deacetylierungsgrad beträgt 86,0 %. In einer 1%-igen wässrigen Lösung beträgt die Viskosität 5 mPa x s, der pH-Wert liegt bei 4.



Abbildung 4.2: Chitosan-HCl

4.4.3 Chitosan 85/15/A1

Diese Substanz wurde ebenfalls von der Heppe GmbH bezogen. Chitosan 85/15/A1 (Abbildung 4.3) wurde in einer 1%-igen Lösung in 1%-iger Essigsäure geliefert. Das mittlere Molekulargewicht liegt zwischen 30 und 50 kDa. Chitosan 85/15/A1 hat einen Feuchtigkeitsgehalt von 15,2 %. Der Ascheanteil liegt bei 0,33 %, der Deacetylierungsgrad bei 86,4 %. Die Substanz hat in einer 1%-igen Lösung in 1%-iger Essigsäure eine Viskosität von 10-15 mPa x s und einen pH-Wert von 4.



Abbildung 4.3: Chitosan 85/15/A1

4.4.4 Chitosan-oligosaccharid-lactat (Oligomer)

Chitosan-oligosaccharid-lactat (Abbildung 4.4) wird von SIGMA-Aldrich vertrieben. Dieses Produkt besitzt ein mittleres Molekulargewicht von 5 kDa. Die Substanz wurde in Form eines gelben Pulvers geliefert, sie ist problemlos in Wasser zu lösen. Nach Herstellerangaben beträgt der Oligosaccharidanteil 60 %, der Deacetylierungsgrad ist größer 90 %. Das Molekül ist aus weniger als 30 Monomeren zusammengesetzt. Die Viskosität liegt bei ca. 6 mPa x s (1%-ige wässrige Lösung), der pH-Wert bei 5.



Abbildung 4.4: Chitosan-oligosaccharid-lactat

4.4.5 N-Acetyl-D-Glucosamin

N-Acetyl-D-Glucosamin (Abbildung 4.5) ist das Monosaccharid von Chitin und der davon abgeleiteten Chitosane. Es ist nicht deacetyliert. Die Substanz wurde von SIGMA-Aldrich in Form eines weißen, wasserlöslichen Pulvers bezogen. Das Pulver muss nach Herstellerangaben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Mit einem mittleren Molekulargewicht von $221,21\text{ Da}$ ist N-Acetyl-D-Glucosamin das Chitinderivat mit der geringsten Molmasse. Der pH-Wert einer 1%-igen wässrigen Lösung beträgt 6.

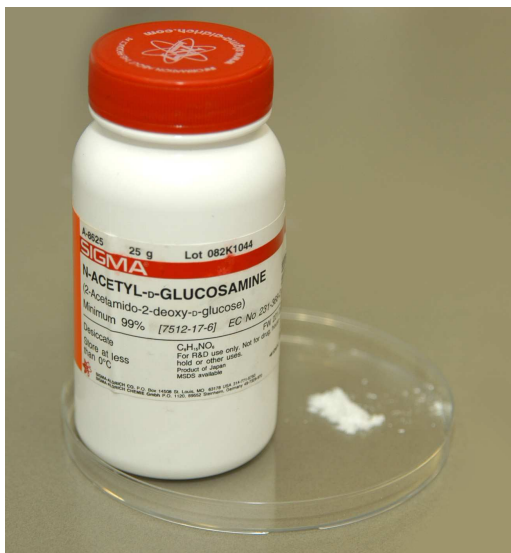


Abbildung 4.5: N-Acetyl-D-Glucosamin

4.5 Verwendete Bakterienstämme und Bakterienanzucht

Für die Untersuchung wurden *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia coli* ATCC 35218, von der Firma DSM aus Braunschweig, verwendet.

Die Stämme wurden bei -80 °C in Microbankgefäßen gelagert. Die Bakterienanzucht erfolgte nach der Arbeitsanweisung der Klinik für Dermatologie der FSU Jena (siehe 9.3).

Nach Entnahme des entsprechenden Microbankgefäßes aus dem Tiefkühlgerät, wurde unter aseptischen Bedingungen mittels einer sterilen Öse eine Kugel entnommen und auf einer Blutagarplatte ausgestrichen, um sie bei 37 °C für 24 Stunden zu bebrüten. In Abbildung 4.6 sind zwei 24-Stunden-Kulturen abgebildet.

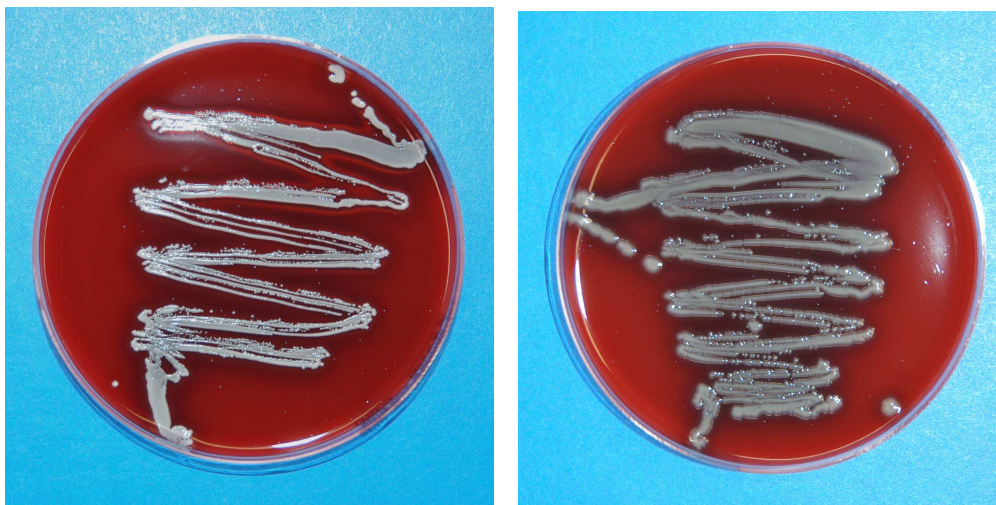


Abbildung 4.6: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (links) und *Escherichia coli* ATCC 35218 (rechts) auf Mueller-Hinton Sang Mouton Agarplatten nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C

Zusätzlich erfolgte eine Überprüfung der Identität von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit ID 32 Staph. Bei diesem System wird anhand von spezifischen biochemischen Reaktionen eine Identifizierung von Mikroorganismen vorgenommen. Auf den Teststreifen wurden 26 Vertiefungen mit Bakteriensuspension einer 24-Stunden-Kultur bestückt und nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C mit Hilfe von Mini-API ausgewertet. Für *Escherichia coli* erfolgte keine zusätzlich Identifizierung.

Während der Messreihen wurde Glucose-Bouillion als Nährlösung für die Bakterien verwendet. Nach Herstellerangaben enthält ein Liter 3 g Fleischextrakt Lab Lemco, 10 g Tryptose, 5 g Glucose und 5 g NaCl. Der pH-Wert beträgt $7,0 \pm 0,2$. Es wurden 23 g in einem Liter Aqua dest. gelöst und anschließend die erhaltene Bouillion für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

4.6 Vorversuche

Vor den Messreihen mit Chitosan wurde eine Keimzahlbestimmung durchgeführt sowie Standardkurven erstellt. Zusätzlich wurden für beide Bakterienstämme Wachstumskurven ohne Chitosan gemessen, von denen dann die Ausgangskeimzahlen für die Messung bestimmt werden konnten.

4.6.1 Keimzahlbestimmung

Da Bakterien aufgrund ihrer geringen Größe für die elektronische Zellzählung z.B. Casy 1 TT (Gerät zur Zellzahlbestimmung) nicht zugänglich sind, erfolgte die Bestimmung durch Auszählung einzelner Kolonien auf einer Agarplatte. Als Arbeitsgrundlage diente die entsprechende Arbeitsanweisung der Klinik für Dermatologie der FSU Jena (siehe 9.4).

Zuerst wurde eine Bakteriensuspension mit der Trübung Mc Farland 0,1 am Densimat eingestellt. Das Densimat ist ein Gerät zur Bestimmung der Trübung von Bakteriensuspensionen und somit der Inokulumgröße. Nach Herstellerangaben wird dabei ein gebündelter Lichtstrahl durch die Flüssigkeit geschickt. Das Gerät misst dabei Streulicht und transmittiertes Licht. Der Quotient aus beiden ergibt dann eine optische Dichte, die proportional zur Bakteriendichte ist und in Mc Farland-Einheiten angegeben wird. Zur Einstellung einer Bakteriensuspension mit bestimmten Mc Farland wurde mit einer Öse von einer Bakterienreinkultur Material entnommen und in einer Ampulle API NaCl 0,85 % Medium gelöst. Mit isotonischer Kochsalzlösung wurde anschließend, unter ständiger Kontrolle am Densimat, bis zur gewünschten Trübung verdünnt. Analog dieser Methode, konnte bei späteren Herstellungen von Bakteriensuspensionen mit bestimmtem Mc Farland vorgegangen werden. Eine genaue Beschreibung kann somit in weiteren Abschnitten dieser Arbeit unterbleiben.

Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit Mc Farland 0,1 mit isotonischer Kochsalzlösung 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 und 1:1000000 verdünnt. Hierbei ergaben 0,1 mL der jeweils höheren Konzentration gemischt mit 0,9 mL Kochsalzlösung die gewünschte Verdünnungsstufe.

Jeweils 0,1 mL jeder Verdünnung wurde auf einer Mueller-Hinton Hypersale E-Test Agarplatte pipettiert, gleichmäßig verteilt und für 24 Stunden aerob bei 37 °C bebrütet.

Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag durch Auszählung der Kolonien auf den Platten mit Hilfe von Colony counter und Mini light box. Die jeweils erhaltene Anzahl konnte anschließend mit dem passenden Verdünnungsgradienten multipliziert werden.

Die Bestimmung erfolgte dreimalig für jeden Bakterienstamm, um aus den Einzelergebnissen einen Mittelwert zu errechnen, der die Keimzahl in KBE/mL für einen Mc Farland 0,1 angibt. Hieraus konnten dann die Keimzahlen für andere Mc Farland bestimmt werden.

4.6.2 Standardkurven

Es wurden für beide Bakterienstämme Standardkurven ermittelt. Ziel war es, die vom Nephelometer gemessenen relativen Einheiten (Nephelometer Units) in Keimzahlen umrechnen zu können.

Hierfür wurden am Densimat mehrere Bakteriensuspensionen mit verschiedenem Mc Farland hergestellt. Diese entsprechen bestimmten, in 4.6.1 Keimzahlbestimmung ermittelten, Keimzahlen. Folgende Trübungen in Mc Farland (McF) wurden eingestellt: McF 0,1; McF 0,5; McF 1; McF 2; McF 3; McF 4; McF 5.

Mit diesen Bakteriensuspensionen konnten die Spalten 1 bis 7 einer Mikrotiterplatte befüllt werden (siehe Tabelle 4.1.). In Spalte 8 gegebene 0,9 % NaCl-Lösung diente als Leerwert (Blank).

Die Platte wurde einmalig im Nephelometer vermessen. Mit Hilfe des Programms zum Nephelometer (NEPHELOstar Galaxy Version 4.30-0) konnte ein Diagramm mit linearer Regressionsfunktion erstellt werden. Dazu wurden die Blank-korrigierten Mittelwerte der Replikate verwendet. Die Funktion lautet: $y = m \cdot x + n$.

Hierbei sind: x-Keimzahl, y-Nephelometer-Wert. Die Werte m und n berechnete das Nephelometer. Somit lässt sich dann für jeden Nephelometer-Wert eine Keimzahl bestimmen.

Tabelle 4.1: Schema der Mikrotiterplatte zur Bestimmung der Standardkurven

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	McF0,1	McF0,5	McF1	McF2	McF3	McF4	McF5	Blank				
B	McF0,1	McF0,5	McF1	McF2	McF3	McF4	McF5	Blank				
C	McF0,1	McF0,5	McF1	McF2	McF3	McF4	McF5	Blank				
D	McF0,1	McF0,5	McF1	McF2	McF3	McF4	McF5	Blank				
E	McF0,1	McF0,5	McF1	McF2	McF3	McF4	McF5	Blank				
F	McF0,1	McF0,5	McF1	McF2	McF3	McF4	McF5	Blank				
G	McF0,1	McF0,5	McF1	McF2	McF3	McF4	McF5	Blank				
H	McF0,1	McF0,5	McF1	McF2	McF3	McF4	McF5	Blank				

4.7 Erstellen der Wachstumskurven mit Chitosan am Nephelometer

4.7.1 Lösen und Verdünnen der Chitosane

Mit Ausnahme des vorgelösten Chitosan 85/15/A1 sind alle verwendeten Chitinderivate als Trockensubstanz erhältlich. Sie mussten dementsprechend vor der Messung gelöst werden.

Als Lösungsmittel fand 0,01 M PBS Verwendung, welches am Vortag hergestellt (eine Tablette auf 200 mL Aqua dest.) und anschließend mit Nalgene steril filtriert wurde.

Aus Chitosan 1130 und Chitosan-HCl musste zunächst eine 1%-ige Lösung hergestellt werden. 1 g Trockensubstanz wurde in 100 mL 0,01 M PBS gelöst. Die Lösung wurde für ca. 30 min im Brutschrank bei 37 °C gelagert, um den Lösevorgang zu beschleunigen. Anschließend konnte steril filtriert werden.

Vor jeder Messung erfolgte die Herstellung von verschiedenen Chitosankonzentrationen (0,5 %; 0,2 %; 0,1 %; 0,05 %; 0,02 %; 0,01 %; 0,005 %; 0,002 %) mittels einer Verdünnungsreihe. Hierfür wurden acht sterile Reagenzgläser mit jeweils 1 mL 0,01 M PBS befüllt. Die Gefäße für die Konzentrationen 0,2 %; 0,02 % und 0,002 % erhielten zusätzlich 0,5 mL PBS, so dass hier die Gesamtmenge 1,5 mL betrug.

Anschließend wurde 1 mL 1%-ige Chitosanlösung in das erste Gefäß, welches mit 1 mL PBS gefüllt war, gegeben. Somit entstand eine 0,5%-ige Lösung, von der wiederum 1 mL entnommen und in das Gefäß für die 0,2%-ige Lösung gegeben wurde. Die Herstellung der anderen Konzentrationen erfolgte in gleicher Weise (siehe Tabelle 4.3).

Für Chitosan 85/15/A1 konnte die Herstellung der 1%-igen Lösung entfallen, ansonsten wurde in analoger Weise verfahren.

Tabelle 4.3: Verdünnungsschema zur Herstellung von verschiedenen Chitosankonzentrationen für Chitosan 1130 und Chitosan-HCL

gewünschte Chitosankonzentration	Herstellung
1 % (10 mg/mL)	1 g Trockensubstanz auf 100 mL 0,01 M PBS
0,5 % (5 mg/mL)	1 mL PBS und 1 mL 1%ige Chitosanlsg.
0,2 % (2 mg/mL)	1,5 mL PBS und 1 mL 0,5%ige Chitosanlsg.
0,1 % (1 mg/mL)	1 mL PBS und 1 mL 0,2%ige Chitosanlsg.
0,05 % (500 µg/mL)	1 mL PBS und 1 mL 0,1%ige Chitosanlsg.
0,02 % (200 µg/mL)	1,5 mL PBS und 1 mL 0,05%ige Chitosanlsg.
0,01 % (100 µg/mL)	1 mL PBS und 1 mL 0,02%ige Chitosanlsg.
0,005 % (50 µg/mL)	1 mL PBS und 1 mL 0,01%ige Chitosanlsg.
0,002 % (20 µg/mL)	1,5 mL PBS und 1 mL 0,005%ige Chitosanlsg.

Als Ausgangskonzentration für Chitosan-oligosaccharid-lactat fand eine 4%-ige, für N-Acetyl-D-Glucosamin eine 16%-ige Lösung Verwendung. Analog der oben dargestellten Verdünnungsreihe wurden dann verschiedene Konzentrationen hergestellt (siehe Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: verwendete Konzentrationen (X) von Chitosan-oligosaccharid-lactat und N-Acetyl-D-Glucosamin

Konzentrationen in %	16	8	4	2	1	0,5	0,2	0,1	0,05	0,02	0,01
Chitosan-oligosaccharid-lactat			X	X	X	X	X	X	X	X	X
N-Acetyl-D-Glucosamin	X	X	X	X	X	X	X	X	X		

4.7.2 Herstellung der Bakteriensuspension und Einstellen der Ausgangskeimzahl

Zuerst wurde am Densimat eine Bakteriensuspension mit einem Mc Farland 0,2 eingestellt. Dies entspricht einer Keimzahl von $6,00E+07$ KBE/mL für *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und $4,00E+07$ KBE/mL für *Escherichia coli* ATCC 35218 (siehe 5.2).

Diese wurde anschließend 1:100 verdünnt, indem 0,1 mL Bakteriensuspension entnommen und mit 9,9 mL Glucose-Bouillion gemischt wurden. Damit war für *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 eine Keimzahl von $6,00E+05$ KBE/mL und für *Escherichia coli* ATCC 35218 von $4,00E+05$ KBE/mL erreicht.

Die endgültige Inokulumgröße halbierte sich dann noch einmal beim Befüllen der Mikrotiterplatte, da 100 µL Bakteriensuspension und 100 µL Chitosanlösung pro Well verwendet wurden. Somit betrug die Ausgangskeimzahl bei den Messreihen $3,00E+05$ KBE/mL für *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und $2,00E+05$ KBE/mL für *Escherichia coli* ATCC 35218.

4.7.3 Beschreibung der befüllten Mikrotiterplatten

An dieser Stelle soll zuerst die Mikrotiterplatte für die Messreihen mit Chitosan 1130 und Chitosan-HCl beschrieben werden (siehe Tabelle 4.5).

In die Wells der Spalte 1 wurden Mc Farland-Standards und der dazugehörige Blank Aqua dest. gefüllt. Es wurden jeweils 200 µL pro Well verwendet. Die Trübung der Mc Farland-Standards wird durch BaSO₄ in bestimmter Konzentration verursacht. Sie dienen dazu technische Störungen des Nephelometers zu erkennen.

In die Spalten 4 bis 12 wurde pro Well jeweils 100 µL Chitosanlösung bestimmter Konzentration gegeben (siehe Tabelle 4.3). Für Chitosan 85/15/A1 entfiel hierbei die Verwendung der vorgelösten 1%-igen Chitosanlösungen, ansonsten wurden die gleichen Konzentrationen verwendet.

Die Spalten 2 und 3, welche kein Chitosan enthielten, dienten als Kontrolle. In Spalte 2 wurde isotonische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %), in Spalte 3 das verwendete Lösungsmittel der Chitosane, 0,01 M PBS, pipettiert. Sie diente bei der Auswertung als Referenzkontrolle. Auch hier fanden Volumen von 100 µL pro Well Verwendung.

Die Wells der Zeilen A bis D wurden zusätzlich mit jeweils 100 µL Bakteriensuspension befüllt. Dadurch halbierten sich die Chitosankonzentrationen und die endgültige Inokulumgröße (siehe 4.7.2) wurde erreicht.

Die Zeilen E bis H erhielten nur Glucose-Bouillon. Diese Blanks (Leerwerte) ergaben somit den Trübungswert, der durch die Chitosanlösung und die Glucose-Bouillon verursacht wurde. Die Werte der Blanks mussten später von den Messwerten abgezogen werden, um die durch die Bakterien hervorgerufene Trübung zu erhalten.

In gleicher Weise konnte die Mikrotiterplatte für die Messreihen mit Chitosan-oligosaccharid-lactat und N-Acetyl-D-Glucosamin befüllt werden. Jedoch wurden die in Tabelle 4.4 genannten Konzentrationen verwendet. Diese halbierten sich ebenfalls auf der Mikrotiterplatte durch Zugabe von Bakteriensuspension bzw. Glucose-Bouillon (Blanks). Die endgültigen Konzentrationen für Chitosan 85/15/A1, Chitosan-oligosaccharid-lactat und N-Acetyl-D-Glucosamin zeigt Tabelle 4.6.

Da Chitosan 85/15/A1 in 1%-iger Essigsäure gelöst war, wurde um ihren Einfluss zu klären Messungen durchgeführt. Hierbei wurde eine Mikrotiterplatte mit Essigsäure in gleichen Konzentrationen wie bei den Messreihen für Chitosan 85/15/A1 befüllt.

Tabelle 4.5: Schema der Mikrotiterplatte, die für die Messreihen mit Chitosan 1130 und Chitosan-HCL verwendet wurde. Es werden die endgültigen Chitosankonzentrationen angegeben. Wells, die Bakteriensuspension enthalten, sind fett umrandet. In Spalte 1 befinden sich Mc Farland-Standards mit ihrem Blank Aqua dest. Alle anderen Wells enthalten Blanks.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Aqua dest.	Kontrolle NaCl 0,9%	Kontrolle PBS	0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%	0,0025%	0,001%
B	McF0,5	Kontrolle NaCl 0,9%	Kontrolle PBS	0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%	0,0025%	0,001%
C	McF1	Kontrolle NaCl 0,9%	Kontrolle PBS	0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%	0,0025%	0,001%
D	McF2	Kontrolle NaCl 0,9%	Kontrolle PBS	0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%	0,0025%	0,001%
E	McF3	Kontrolle NaCl 0,9%	Kontrolle PBS	0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%	0,0025%	0,001%
F	McF4	Kontrolle NaCl 0,9%	Kontrolle PBS	0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%	0,0025%	0,001%
G	McF5	Kontrolle NaCl 0,9%	Kontrolle PBS	0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%	0,0025%	0,001%
H	Aqua dest.	Kontrolle NaCl 0,9%	Kontrolle PBS	0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%	0,0025%	0,001%

Tabelle 4.6: Konzentrationen (in %) von Chitosan-oligosaccharid-lactat und N-Acetyl-D-Glucosamin auf der Mikrotiterplatte

Spalte	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Chitosan 85/15/A1	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001	
Chitosan-oligosaccharid-lactat	2	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
N-Acetyl-D-Glucosamin	8	4	2	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025

4.7.4 Messung im Nephelometer

Die Mikrotiterplatten wurden mit einer Abdeckfolie (Breathe-Easy) versehen und anschließend in das Mikroplattennephelometer (NEPHELOstar Galaxy) gegeben.

Zuerst erfolgte die Bestimmung des Ausgangswertes für die befüllte Mikrotiterplatte. Dabei wurde im Modus Ausgangszellzahl jedes Well einmalig vermessen.

Danach konnte das Nephelometer für die Messung der Wachstumskurve eingestellt werden. In diesem Modus misst das Gerät stündlich die Trübung in den einzelnen Wells. Hierbei wurden folgende wesentliche Einstellungen vorgenommen: (siehe Tabelle 4.7)

Tabelle 4.7: Einstellung des Nephelometers (NEPHELOstar Galaxy) für die Messreihen

Einstellung	Erklärung
Number of cycles: 20	Es wurden 20 Messzyklen eingestellt, da nach 20 Stunden keine Änderungen mehr auftraten. Dies wurde bei der Messung ohne Chitosan über 24 Stunden festgestellt.
Shaking: Vor jeder Messung	Um über die gesamte Messreihe eine homogene Suspension zu erhalten, wurde die Platte vor jeder Messung geschüttelt.
Shaking time: 3600 s	3600 s, also 1h wurde die Platte vor jedem Zyklus geschüttelt.
Shaking width: 5mm	Umfang der Bewegung der Mikrotiterplatte
Laser beam focus: 2,5 mm	Brennweite des Lasers
Measurement interval time: 0,1 s	Zeit, die für eine Messung eines Wells benötigt wird
Positioning delay: 0,1s	Zeit, die zur Positionierung eines Wells benötigt wird
Gain: 122	Verstärkung
Reading: horizontal	Ableserichtung der Wells während der Messung
Temperature: 37 °C	Temperatur während der Messung

4.7.5 pH-Messung

Vor den Messungen wurden die pH-Werte der Wells A2 bis A12, mit Hilfe von Universalindikatorpapier (pH 0-14), bestimmt. Hierbei kamen zwei Mikrotiterplatten, die in gleicher Weise wie für die Messreihen befüllt wurden, zur Anwendung.

Nach den Messungen erfolgte ebenfalls eine pH Bestimmung. Dabei wurde nach der Entfernung der Abdeckfolie Universalindikatorpapier in die Wells A2 bis A12 der Mikrotiterplatte gebracht.

4.7.6 Überimpfen der Bakteriensuspension auf Agarplatten

Nach Abschluss der Messungen wurde der Inhalt der Wells, in denen kein Bakterienwachstum zu erkennen war, auf Mueller-Hinton Sang Mouton Agarplatten gebracht. Dabei wurden pro Konzentration aus einem entsprechenden Well 200 µL entnommen und überimpft. Die Probe konnte anschließend mit einer sterilen Öse auf der Agarplatte ausgestrichen werden. Als Kontrolle wurde auch ein beliebiges Well mit erfolgtem Bakterienwachstum ausplattiert.

Nach 24 Stunden Lagerung im Brutschrank bei 37 °C konnte kontrolliert werden, ob es zu einem Bakterienwachstum gekommen war. Es wurde nur die Entstehung von Bakterienkolonien bewertet, ohne dass eine Auszählung erfolgte.

4.8 Mathematische Auswertung der Messwerte

Die erhaltenen Ergebnisse wurden mathematisch und statistisch wie folgt ausgewertet:

Die Messungen ergaben relative Nephelometereinheiten. Jedem Messwert wurde ein Blank (Leerwert) zugeordnet, der von diesem subtrahiert wurde (z.B. A2-E2, B2-F2 usw.).

Für jede Konzentration ergaben sich somit vier Werte. Da jede Messreihe vier Mal durchgeführt wurde, ergaben sich insgesamt 16 Werte, aus welchen Mittelwerte gebildet und Wachstumskurven dargestellt wurden.

Für die Zeitpunkte 4, 6, 10 und 20 wurde der relative Anteil in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit PBS) errechnet. Diese Auswertung wurde mit Hilfe von Microsoft Excel durchgeführt.

Mit SPSS konnte für oben genannte Zeitpunkte Boxplots dargestellt und der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt werden. Hierbei wurde die Signifikanz zur Referenzkontrolle (Kontrolle mit PBS) geprüft. Werte $p \leq 0,05$ werden im Folgenden als signifikant bezeichnet.

5 Ergebnisse

5.1 Identifikation von *Staphylococcus aureus* mit ID 32 Staph

Wie unter 4.5 erläutert, wurde die Identität von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 vor der Anzucht mit ID 32 Staph überprüft. Die Auswertung mit Mini-API ergab, dass es sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 % um *Staphylococcus aureus* handelt. Eine Verunreinigung des Microbankgefäßes konnte somit ausgeschlossen werden.

5.2 Keimzahlbestimmung

Die Keimzahlbestimmung wurde durchgeführt um jeder Bakteriensuspension mit definierter Trübung eine Keimzahl in KBE/mL zuordnen zu können (siehe 4.6.1).

Die Verdünnungsstufen 1:10 bis 1:1000 konnten nicht ausgewertet werden, da die Kolonien auf den Agarplatten mengenmäßig nicht differenzierbar waren. Die Anzahl der Kolonien für die restlichen Verdünnungen sind in Tabelle 5.1 und 5.2 dargestellt. Aus ihnen wurden Mittelwerte gebildet, die nach Multiplikation mit dem entsprechenden Faktor Keimzahlen ergaben. Das Gesamtergebnis konnte anschließend errechnet werden. Eine Trübung von Mc Farland 0,1 entspricht somit einer Keimzahl von $2,71\text{E}+07$ KBE/mL für *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und $1,68\text{E}+07$ KBE/mL für *Escherichia coli* ATCC 35218. Diese Ergebnisse wurden für die folgenden Berechnungen gerundet.

Tabelle 5.1: Keimzahlbestimmung für *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Verdünnung/ Faktor	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert	Keimzahl in KBE/mL
1:10	nicht auswertbar				
1:100	nicht auswertbar				
1:1000	nicht auswertbar				
1:10000	293	206	223	240,666667	$2,41\text{E}+07$
1:100000	16	29	27	24	$2,40\text{E}+07$
1:1000000	4	3	3	3,33333333	$3,33\text{E}+07$

errechnetes Ergebnis für McF 0,1: $2,71\text{E}+07$

gerundetes Ergebnis für McF 0,1: **$3,00\text{E}+07$**

Tabelle 5.2: Keimzahlbestimmung für *Escherichia coli* ATCC 35218

Verdünnung/ Faktor	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Mittelwert	Keimzahl in KBE/mL
1:10	nicht auswertbar				
1:100	nicht auswertbar				
1:1000	nicht auswertbar				
1:10000	111	186	114	137	1,37E+07
1:100000	10	16	14	13,33333333	1,33E+07
1:1000000	3	2	2	2,333333333	2,33E+07
errechnetes Ergebnis für McF 0,1:					1,68E+07
gerundetes Ergebnis für McF 0,1:					2,00E+07

Theoretisch lässt sich nun für jede Trübung die passende Keimzahl errechnen. Hierbei wird die gerundete Keimzahl für Mc Farland 0,1 mit dem entsprechenden Faktor multipliziert. Für einige Trübungen zeigt Tabelle 5.3 exemplarisch die erhaltenen Ergebnisse.

Tabelle 5.3: Berechnung der Keimzahlen für verschiedenen Trübungen (in Mc Farland)

Mc Farland/ Verdünnung	Faktor	Keimzahl/mL <i>S. aureus</i> ATCC 25923	Keimzahl/mL <i>E. coli</i> ATCC 35218
2	20	6,00E+08 KBE/mL	4,00E+08 KBE/mL
1	10	3,00E+08 KBE/mL	2,00E+08 KBE/mL
0,1	1	3,00E+07 KBE/mL	2,00E+07 KBE/mL
0,1 1:10	1/10	3,00E+06 KBE/mL	2,00E+06 KBE/mL
0,1 1:100	1/100	3,00E+05 KBE/mL	2,00E+05 KBE/mL

5.3 Standardkurven

Für beide Bakterienstämme wurden Standardkurven erstellt, die den Zusammenhang zwischen Keimzahlen und relativen Nephelometereinheiten (Nephelometer Units) herstellen. Abbildung 5.1 zeigt exemplarisch die Standardkurve für *Escherichia coli* ATCC 35218.

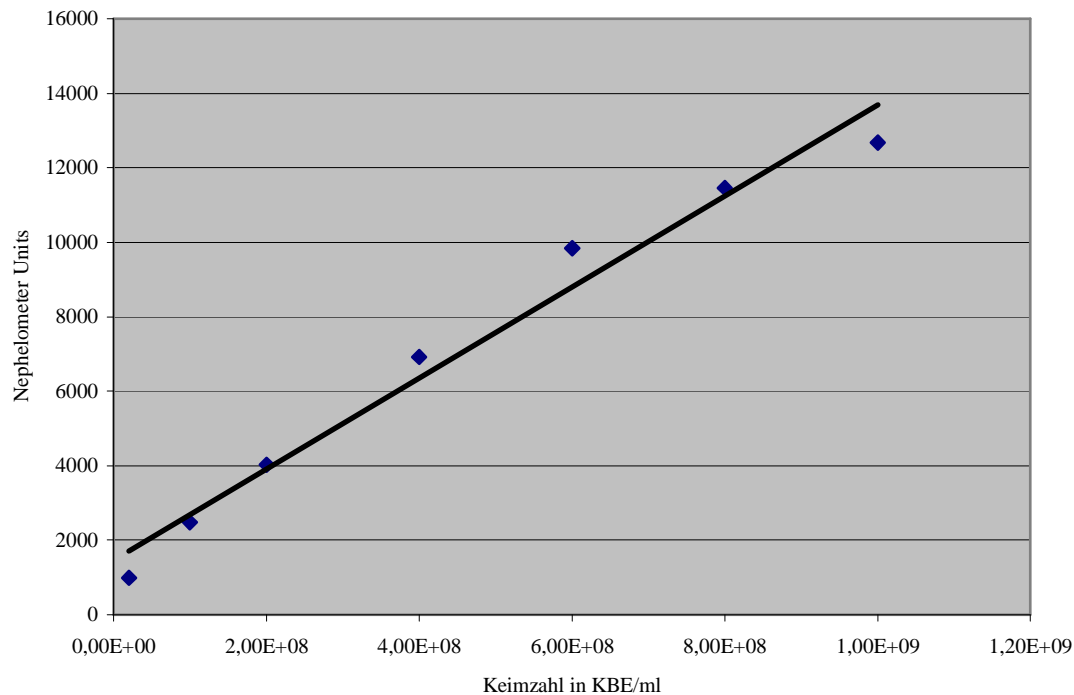


Abbildung 5.1: Standardkurve für *Escherichia coli* ATCC 35218

Das Diagramm zeigt eine lineare Regressionsfunktion mit der Formel: $y = m x + n$. Mit Hilfe der Software des Nephelometers erhält man die Werte m und n (siehe Tabelle 5.4). Es lässt sich somit für jeden Nephelometer-Wert eine Keimzahl bestimmen.

Tabelle 5.4: berechnete Werte m und n der Formel $y = m x + n$

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 35218
m	9,201E-06	1,222E-05
n	3,303E+02	1,465E+03

5.4 Wachstumskurven ohne Chitosan

Von beiden Bakterienstämmen wurden Wachstumskurven ohne Chitosan gemessen. Wie unter 4.6.3 erläutert, konnten verschiedene Ausgangskeimzahlen verwendet werden. Abbildung 5.2 zeigt die erhaltenen Wachstumskurven für *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Es zeigte sich, dass bei höheren Ausgangskeimzahlen, nach entsprechendem exponentiellem Anstieg, schneller eine Plateauphase erreicht wurde. Die Proben mit mittleren Startkonzentrationen benötigten sechs bis acht Stunden zum Erreichen des Plateaus.

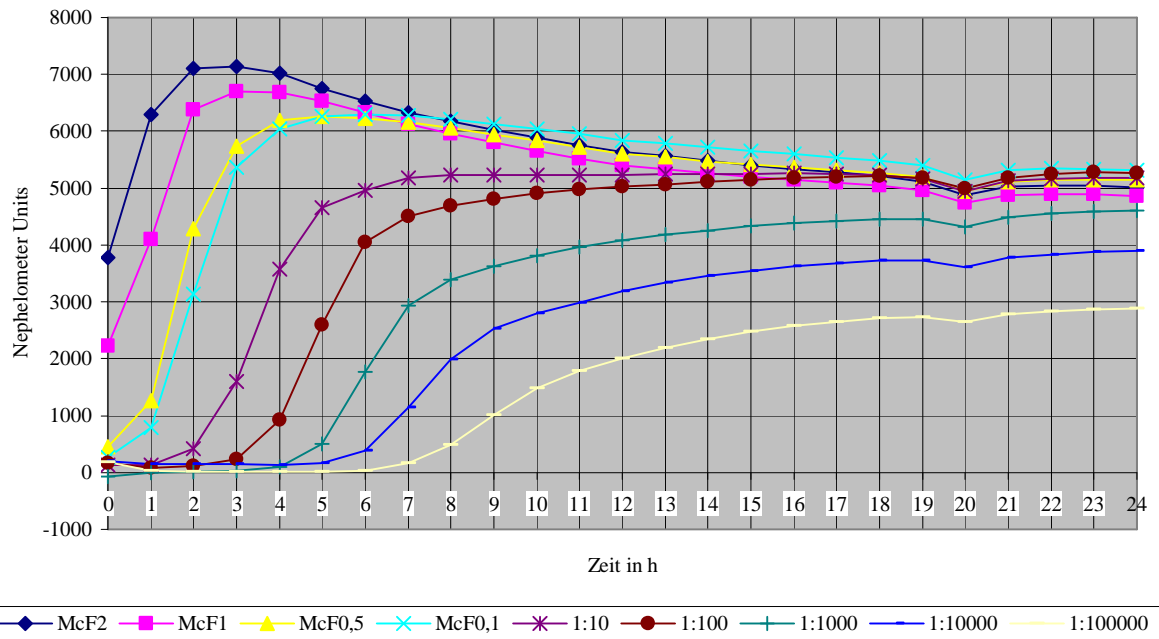


Abbildung 5.2: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ohne Chitosan

In Abbildung 5.3 sind die entsprechenden Wachstumskurven für *Escherichia coli* ATCC 35218 dargestellt. Diese zeigen ebenfalls einen typischen Verlauf. Der Anstieg ist gegenüber *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 deutlich steiler. Somit wird die Plateauphase eher erreicht. Bei mittleren Ausgangskeimzahlen wurden nur drei bis fünf Stunden benötigt.

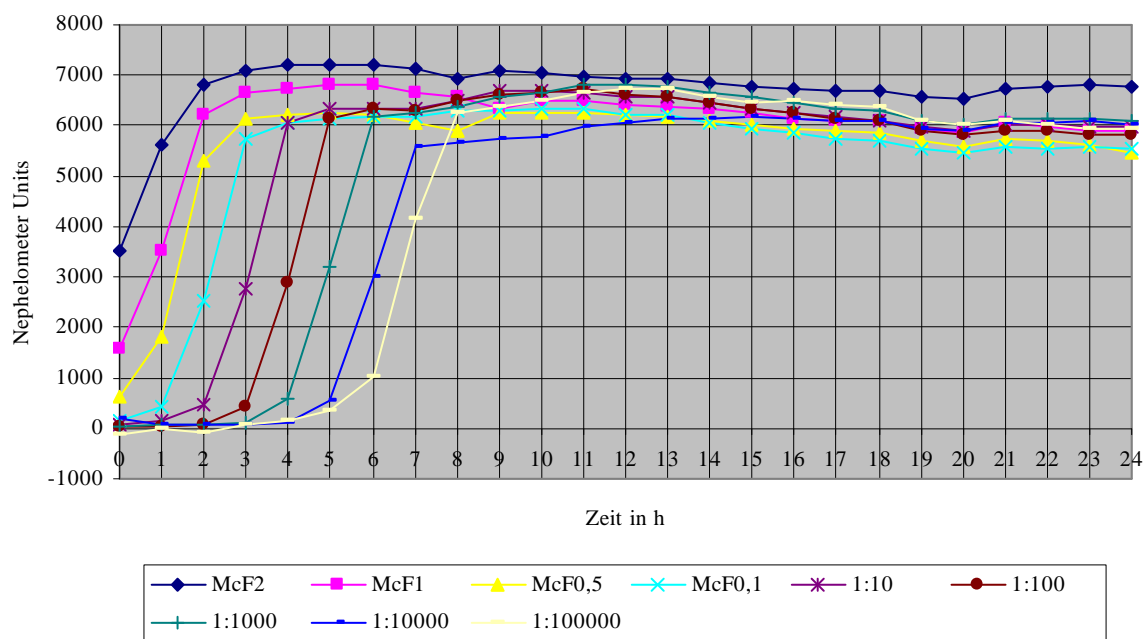


Abbildung 5.3: *Escherichia coli* ATCC 35218 ohne Chitosan

Aus den erhaltenen Wachstumskurven wurde die Ausgangskeimzahl für die folgenden Messreihen gewählt. Sie wurde durch Verdünnung einer Bakteriensuspension mit Mc Farland 0,1, 1:100 mit physiologischer Kochsalzlösung, eingestellt. Die Ausgangskeimzahl betrug somit $3,00\text{E}+05$ KBE/mL für *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und $2,00\text{E}+05$ KBE/mL für *Escherichia coli* ATCC 35218.

Die Verwendung der höheren Startkonzentrationen erschien nicht sinnvoll, da die Kurven das Plateau zu zeitig erreichen. Bei niedrigeren Ausgangskeimzahlen (1:10000, 1:100000) besteht durch die Vielzahl an Verdünnungsschritten die Gefahr fehlerhafte Konzentrationen zu verwenden. Zusätzlich wird bei *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nur ein niedriges Plateau erreicht, eine Wachstumshemmung während der Messreihen wäre nur schwer differenzierbar. Auch konnte die Dauer der folgenden Messungen auf 20 Stunden (20 Zyklen) begrenzt werden, da in den letzten vier Stunden keine Änderung der Nephelometer-Werte auftraten.

5.5 Ergebnisse der Messreihen mit Chitosan

Die erhalten Messwerte wurden wie unter 4.8 beschrieben ausgewertet. Die graphische Darstellung erfolgt für jedes Chitosan in gleicher, nachfolgend beschriebener, Weise.

Die entsprechende Wachstumskurve wird abgebildet, sie zeigt die Zunahme der Trübung (in Nephelometer Units) im zeitlichen Verlauf. Auf eine Umrechnung in Keimzahlen, wie unter 5.3 beschrieben, wird hier aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Zusätzlich werden für die ausgewählten Zeitpunkte 4, 6, 10 und 20 Stunden Boxplots dargestellt, welche die Verteilung der gemessenen Einzelwerte (jeweils 16 Einzelwerte pro Konzentration) und den Medianwert abbilden.

Die erhaltenen Signifikanzwerte und die relativen Anteile in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit Puffer) werden in tabellarischer Form präsentiert. Signifikanzwerte $p \leq 0,05$ werden im Folgenden als signifikant bezeichnet.

5.6 Wirkung von Chitosan 1130

Die Abbildungen 5.4 und 5.5 sowie Tabelle 5.5 zeigen Wachstumskurve, Werteverteilung und Signifikanz für *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan 1130.

Chitosan 1130 (MG: 120 kDa, Deacetylierungsgrad: 85,2 %) zeigt in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration eine deutlich hemmende Wirkung auf *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. In den am höchsten konzentrierten Chitosanlösungen (0,5 %, 0,25 %, 0,1 %) ist kein Bakterienwachstum zu erkennen. Mit Ausnahme der 4-Stunden-Werte sind alle Signifikanzwerte $< 0,001$.

Bei niedrigeren Chitosankonzentrationen kommt es zu stärkerem Bakterienwachstum, welches sich in höheren Messwerten (relative Nephelometereinheiten) zeigt. Die Lösungen mit den Konzentrationen 0,025 % und 0,05 % erreichen trotzdem nur ein sehr niedriges Plateau. Auch nach 20 Stunden Inkubation werden nicht mehr als 50 % des entsprechenden Trübungswertes der Referenz erreicht.

Chitosan 1130 in den Konzentrationen 0,001 % bis 0,01 % zeigt in den ersten sechs Stunden keine Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle mit Puffer. Die gemessenen Werte sind teilweise sogar höher als die der Referenz. Jedoch steigt im weiteren Verlauf die Kontrollkurve stärker an als die Proben. Somit ergibt sich für die Zeitpunkte 10 und 20 Stunden ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit Puffer. Die niedrigste Konzentration (0,001 %) erreicht immerhin 80 % der Referenz.

Die Verteilung der Messwerte (siehe Abbildung 5.5) zeigt insbesondere nach vier und sechs Stunden eine ausgeprägte Streuung der Einzelmessungen. Dies lässt sich damit erklären, dass zu diesen frühen Zeitpunkten in einigen Wells bereits ein Bakterienwachstum stattgefunden hat, während in anderen noch die Ausgangskonzentrationen vorliegen. Im weiteren Verlauf verringert sich die Streuung deutlich. Auch die Wells, in denen das Bakterienwachstum später begonnen hat, erreichen die maximale Trübung. Die Werte nähern sich einander an.

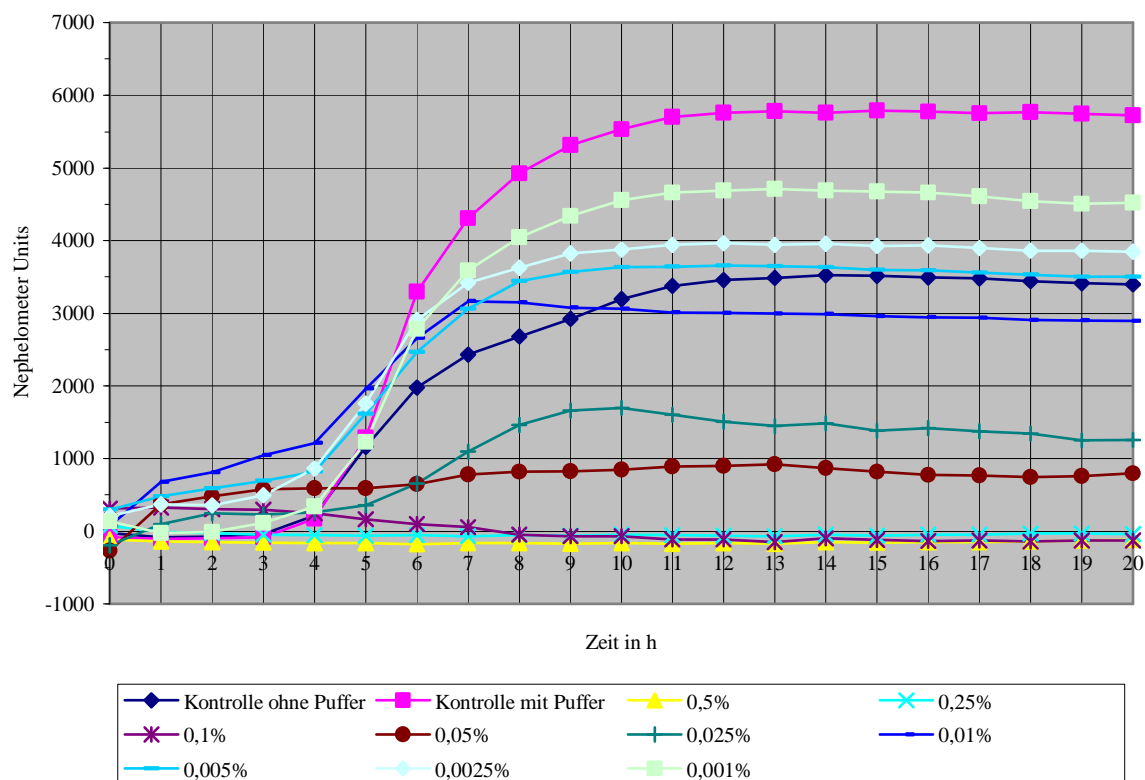


Abbildung 5.4: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan 1130

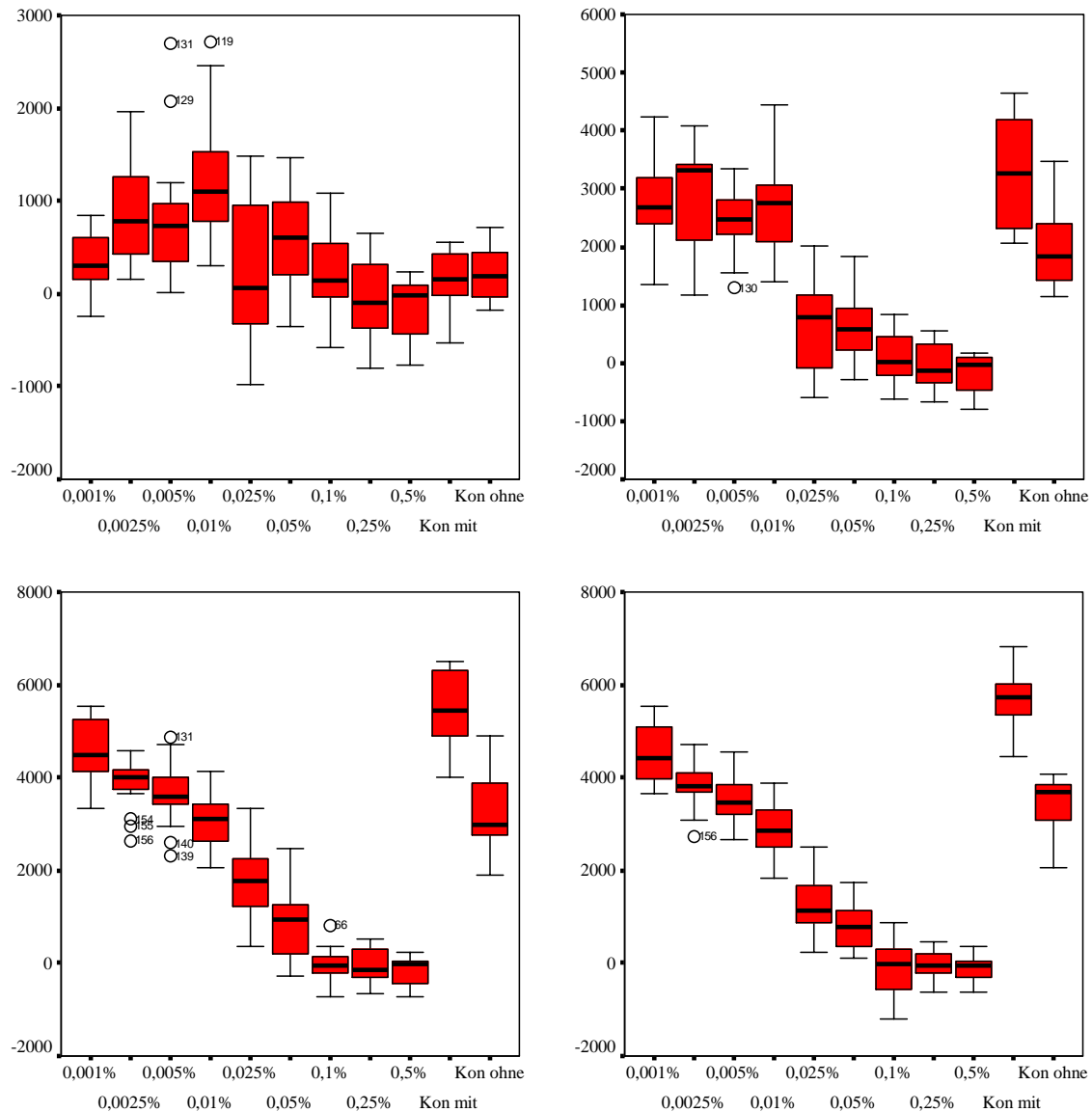


Abbildung 5.5: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan 1130, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts)

Tabelle 5.5: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan 1130, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit Puffer), signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt

		0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%	0,0025%	0,001%
4 h	p	0,008	0,119	0,897	0,032	0,985	<0,001	<0,001	<0,001	0,184
	Anteil (%)	0	0	144	343	150	704	475	501	199
6 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,119	0,056	0,254	0,341
	Anteil (%)	0	0	3	20	20	81	75	88	85
10 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,003
	Anteil (%)	0	0	0	15	31	55	66	70	82
20 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	Anteil (%)	0	0	0	14	22	51	61	67	79

Unter dem Einfluss von Chitosan 1130 ist eine Wachstumshemmung von *Escherichia coli* ATCC 35218 zu erkennen. In den Abbildungen 5.6 und 5.7 sind die erhaltenen Ergebnisse graphisch dargestellt. Die entsprechenden Signifikanzwerte werden in Tabelle 5.6 angegeben. Mit Ausnahme des 4-Stunden-Wertes der Probe 0,001 %, zeigen alle Werte einen signifikanten Unterschied zur Referenz (siehe Tabelle 5.6). Chitosan 1130 in den Konzentrationen 0,1 % bis 0,5 % führt zu einer vollständigen Wachstumshemmung der Bakterien, die gemessenen Trübungswerte bleiben auf dem Ausgangsniveau. Auch die Lösung mit der Konzentration 0,05 % zeigt nur einen geringen Anstieg der Wachstumskurve. Die niedriger konzentrierten Proben (0,001 % bis 0,025 %) steigen hingegen nach drei Stunden deutlich an. Am Anfang sind hier noch deutliche Abstufungen zwischen den einzelnen Kurven erkennbar. Jedoch kommt es am Ende der Messung zur Annäherung der ermittelten Werte. Der prozentuale Anteil zur Kontrolle mit Puffer liegt hierbei nach 20 Stunden zwischen 50 % und 60 %. Die niedrigste Konzentration (0,001 %) erzielt die geringste Wachstumshemmung von *Escherichia coli* ATCC 35218.

Ähnlich den Messungen von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan 1130 zeigen die Einzelmesswerte nach vier und sechs Stunden die stärkste Streuung (siehe Abbildung 5.7). Zu den späteren Zeitpunkten nähern sich die ermittelten Werte einander an.

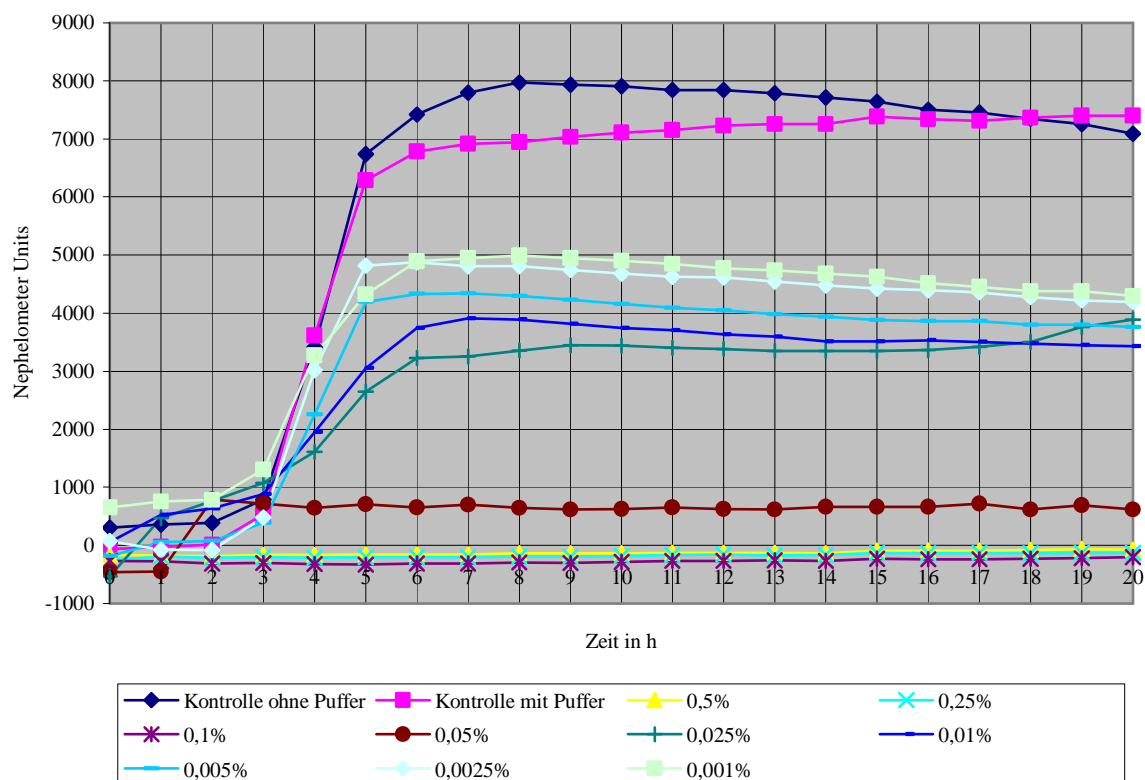


Abbildung 5.6: *Escherichia coli* ATCC 35218 mit Chitosan 1130

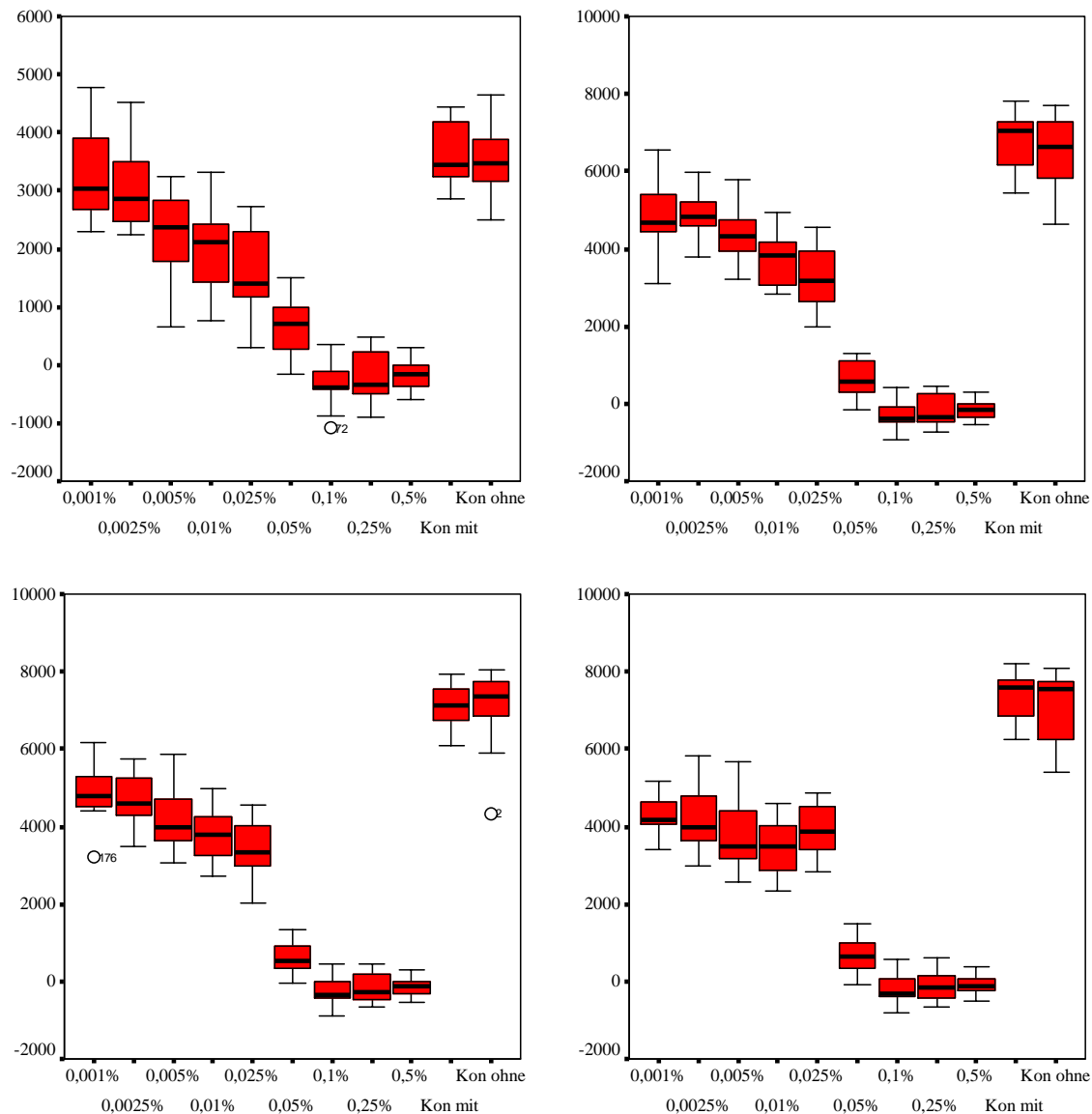


Abbildung 5.7: *Escherichia coli* ATCC 35218 mit Chitosan 1130, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts)

Tabelle 5.6: *Escherichia coli* ATCC 35218 mit Chitosan 1130, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit Puffer), signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt

		0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%	0,0025%	0,001%
4 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,021	0,127
	Anteil (%)	0	0	0	18	44	54	62	83	91
6 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	Anteil (%)	0	0	0	10	48	55	64	72	72
10 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	Anteil (%)	0	0	0	9	48	53	59	66	69
20 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	Anteil (%)	0	0	0	8	53	46	51	57	58

5.7 Wirkung von Chitosan-HCl

Chitosan-HCl (MG: 30 kDa, Deacetylierungsgrad: 86 %) zeigt eine ähnliche Wirkung auf *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 wie Chitosan 1130. In Abbildung 5.8 und 5.9 sowie Tabelle 5.7 sind die entsprechende Wachstumskurve, Messwerteverteilung und Signifikanzwerte dargestellt. Die Proben mit den Chitosankonzentrationen von 0,05 % bis 0,5 % lassen kein Bakterienwachstum erkennen. Die Trübungswerte bleiben auf dem Ausgangsniveau, mit Ausnahme des 4-Stunden-Wertes für 0,05 % besteht ein signifikanter Unterschied zur Referenz.

Die Wachstumskurve mit der Konzentration 0,025 % steigt bis zum 8-Stunden-Wert an, um anschließend bis auf den Ausgangswert abzufallen. Als Erklärung hierfür ist ein fehlerhafter Trübungsanstieg der entsprechenden Blanks zu nennen. Dies kann durch Ausfällen von Chitosan verursacht werden.

Bei Messungen mit niedrigen Konzentrationen (0,001 % bis 0,01 %) an Chitosan, zeigt sich lediglich eine geringe Hemmung des Bakterienwachstums. Die Kurven nähern sich der Kontrolle mit Puffer. Jedoch zeigen alle, mit Ausnahme der 0,001%-igen Lösung, ab dem 10-Stunden-Wert einen signifikanten Unterschied zur Referenz.

Die höchsten Trübungswerte erreicht 0,001%-iges Chitosan-HCl. Nach 20 Stunden werden immerhin 88 % der Kontrolle erreicht, die Signifikanz beträgt 0,003.

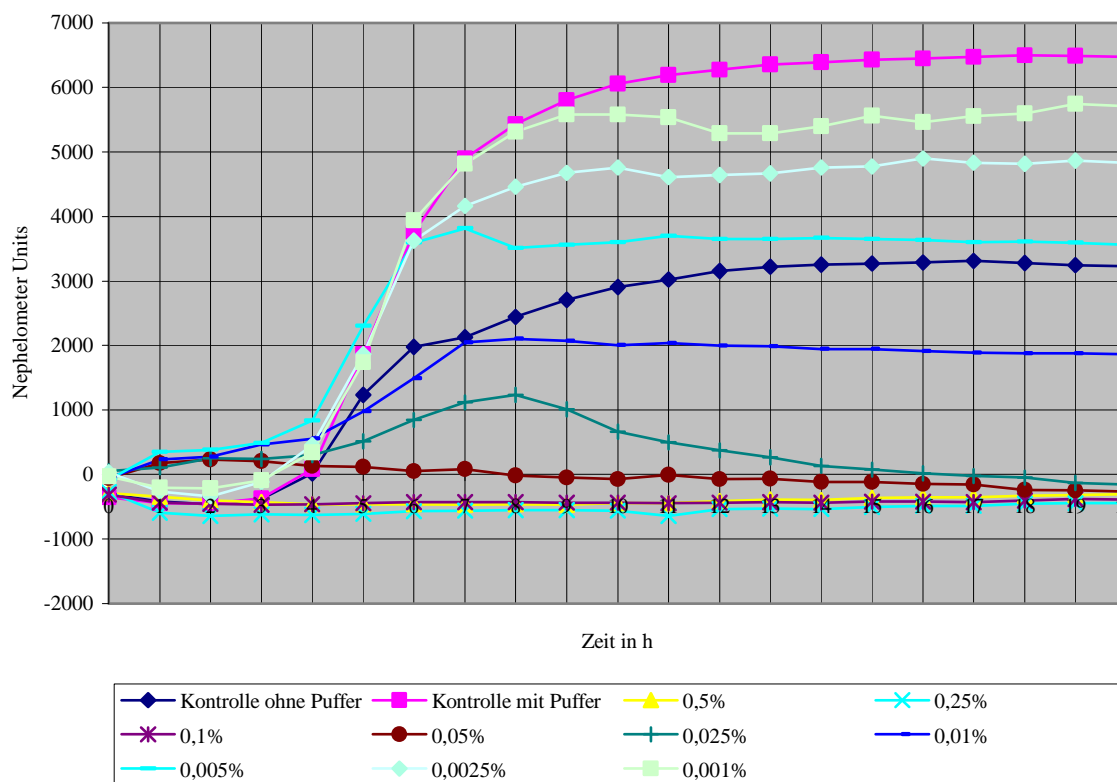


Abbildung 5.8: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan-HCl

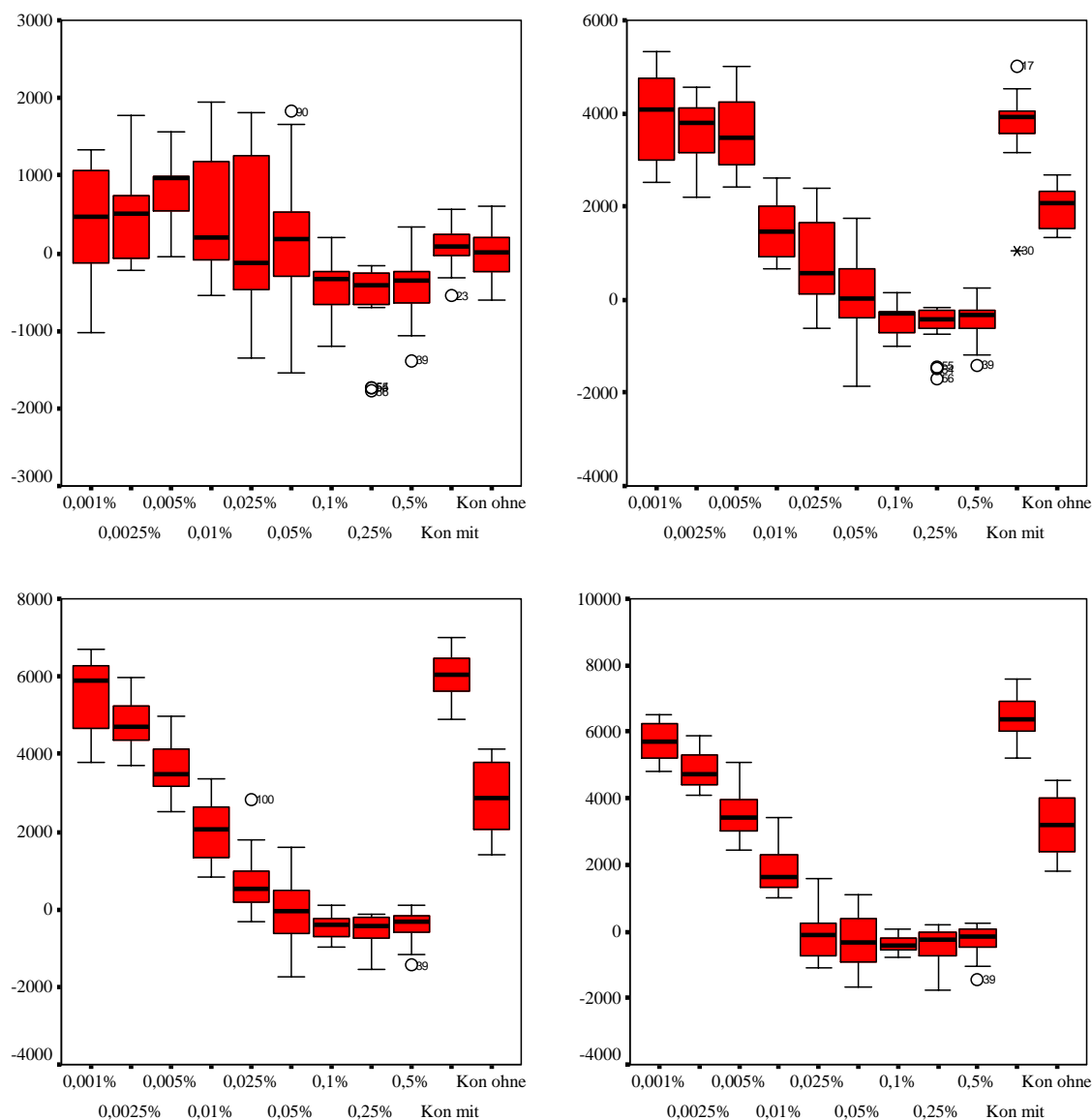


Abbildung 5.9: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan-HCl, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts)

Tabelle 5.7: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan-HCl, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit Puffer), signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt

		0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%	0,0025%	0,001%
4 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	0,780	0,897	0,171	<0,001	0,051	0,086
	Anteil(%)	0	0	0	157	354	656	977	534	399
6 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,305	0,642	0,616
	Anteil(%)	0	0	0	1	23	40	96	97	105
10 h	P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,287
	Anteil(%)	0	0	0	0	11	33	60	79	92
20 h	P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,003
	Anteil(%)	0	0	0	0	0	29	55	74	88

Auch auf *Escherichia coli* ATCC 35218 wirkt Chitosan-HCl wachstumshemmend. Die Wirkung ist jedoch geringer als bei Chitosan 1130. Dies wird aus den Abbildungen 5.10 und 5.11 sowie der Tabelle 5.8 deutlich. Die Chitosankonzentrationen von 0,1 % bis 0,5 % führen zu einer vollständigen Wachstumshemmung. Auch für 0,05 %-iges Chitosan-HCl wird nur ein geringer Anstieg der Trübungswerte verzeichnet, während die folgende Verdünnungsstufe (0,025 %) ca. 40 % der Referenz erreicht. Für alle oben genannten Konzentrationen ist die Signifikanz kleiner 0,001 %. Dies ähnelt den ermittelten Kurven und Werten für Chitosan 1130.

Für die Proben mit den Konzentrationen 0,001 % bis 0,01 % zeigt sich hingegen ein deutlicher Unterschied. Im Gegensatz zu Chitosan 1130 erreichen die Werte fast die Referenzkurve, so liegt zum Beispiel der 10-Stunden-Wert der Kurven 0,01 % und 0,005 % bei 95 % beziehungsweise 97 % der Kontrolle. Nach 20 Stunden zeigen zwar alle Werte einen signifikanten Unterschied zur Referenz, jedoch erreichen die Kurven 70 % bis 89 %.

Die Verteilung der Einzelwerte zeigt für beide Bakterienstämme die stärkste Streuung nach vier Stunden, welche sich im weiteren Verlauf der Messungen vermindert. Insbesondere für die Konzentrationen 0,01 % bis 0,05 % wurden unterschiedliche Einzelwerte gemessen. Wahrscheinlich zeigen in diesen Konzentrationen einige Proben bereits ein Bakterienwachstum, während andere noch vollständig gehemmt werden.

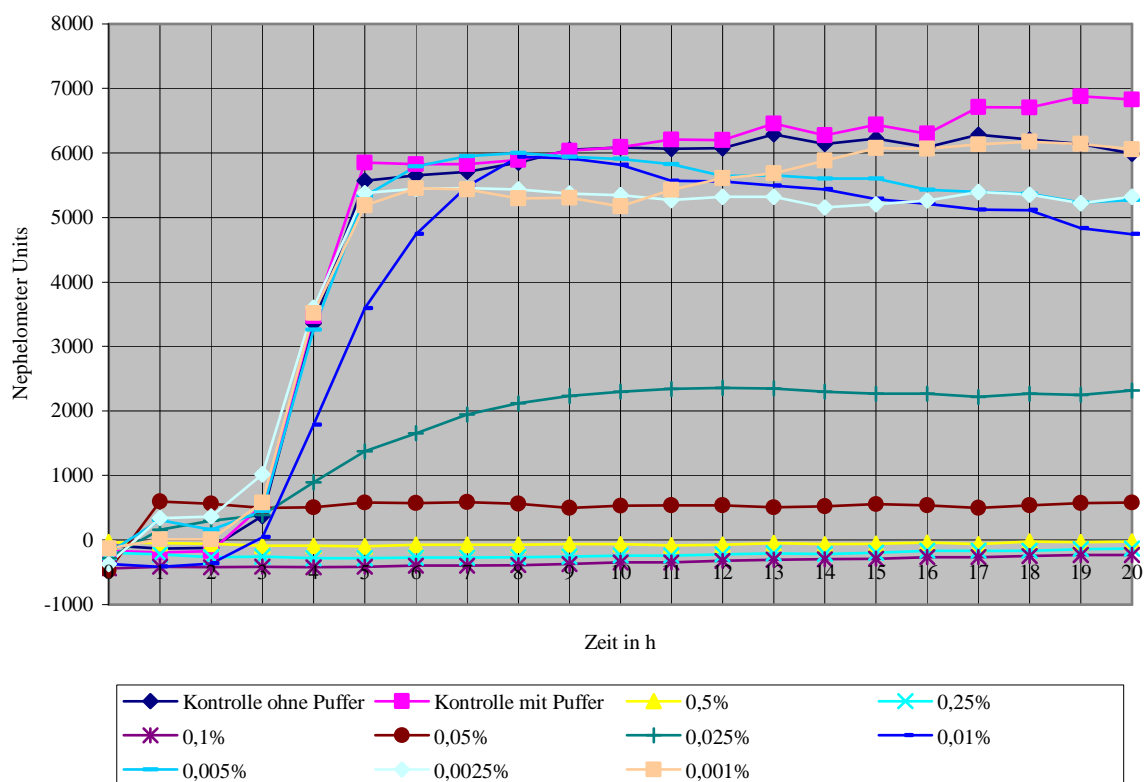


Abbildung 5.10: *Escherichia coli* ATCC 35218 mit Chitosan-HCl

5.8 Wirkung von Chitosan 85/15/A1

Die Abbildungen 5.12 und 5.13 sowie Tabelle 5.9 zeigen Wachstumskurve, Messwerteverteilung und Signifikanz für *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan 85/15/A1 (MG: 30-50 kDa, Deacetylierungsgrad: 86,4 %).

In hohen Chitosankonzentrationen (0,025 % bis 0,25 %) wird eine Vermehrung der Keime verhindert, die Trübungswerte bleiben auf dem Ausgangsniveau. Das Chitosan bewirkt eine vollständige Wachstumshemmung bei diesen Konzentrationen.

Im Gegensatz hierzu, ist ab der Verdünnungsstufe 0,01 % ein deutliches Wachstum der Mikroorganismen zu erkennen. Die Wachstumskurve mit der Konzentration 0,01 % erreicht bereits 80 % der Kontrolle mit Puffer, ein signifikanter Unterschied kann trotzdem noch festgestellt werden. Mit sinkender Konzentration von Chitosan 85/15/A1 ist eine weitere Verminderung der Wirkung erkennbar. Die Proben von 0,001 % bis 0,005 % reichen nahezu an die Referenzkurve. Die entsprechenden Signifikanzwerte sind für alle verwendeten Zeitpunkte größer 0,05. Somit wird deutlich, dass kein nachweisbarer Unterschied zwischen Referenzkontrolle und genannten Lösungen besteht. Im Gegensatz zu Chitosan 1130 und Chitosan-HCl ist keine Abstufung zwischen den Wachstumskurven der einzelnen Verdünnungen erkennbar. Wird eine bestimmte Konzentration unterschritten, erreichen die Proben ein der Kontrolle entsprechendes vollständiges Keimwachstum.

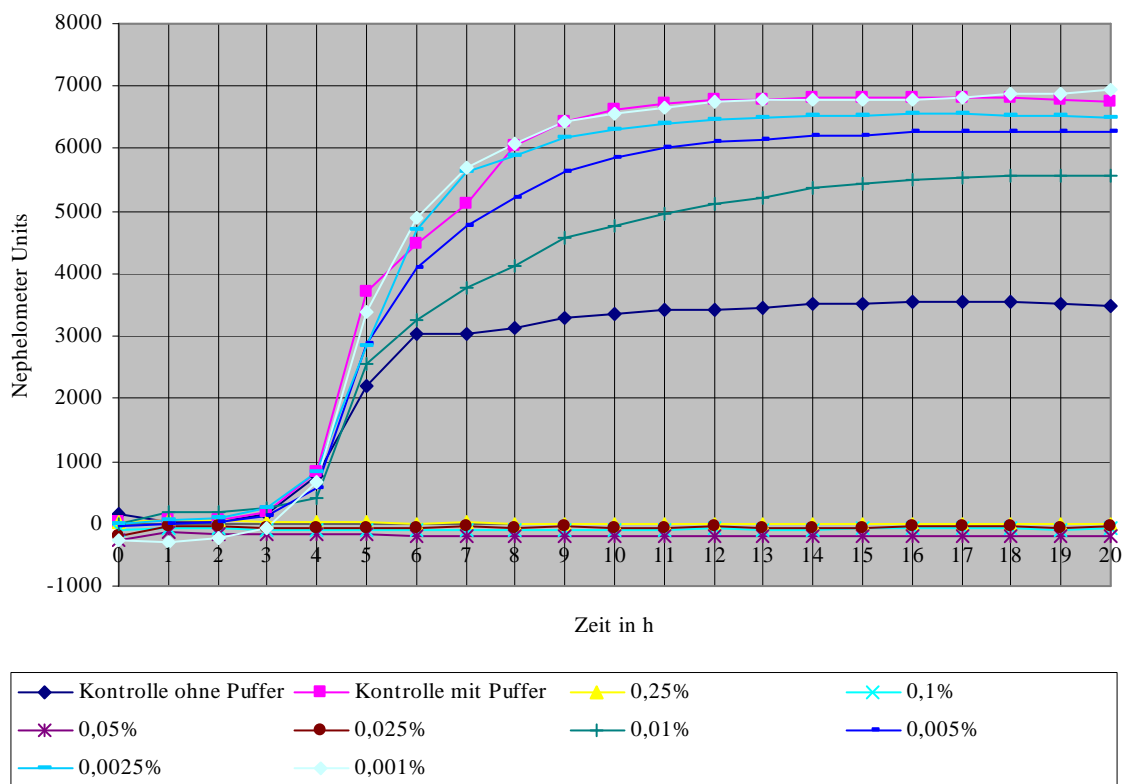


Abbildung 5.12: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan 85/15/A1

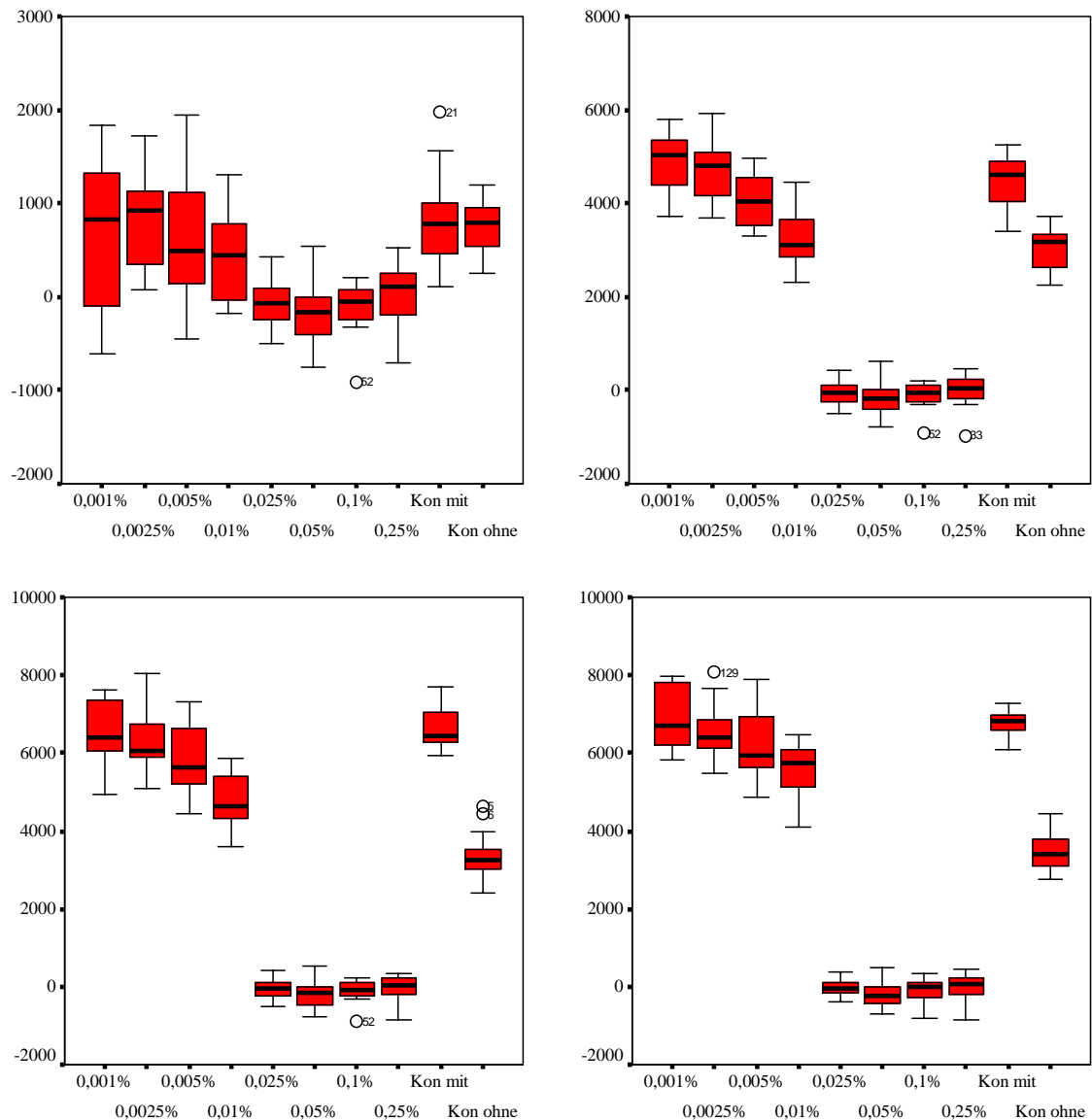


Abbildung 5.13: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan 85/15/A1, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts)

Tabelle 5.9: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan 85/15/A1, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit Puffer), signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt

		0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%	0,0025%	0,001%
4 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,043	0,323	0,897	0,752
	Anteil(%)	3	0	0	0	50	71	100	80
6 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,057	0,287	0,061
	Anteil(%)	0	0	0	0	73	91	105	109
10 h	P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,051	0,061	0,780
	Anteil(%)	0	0	0	0	72	89	95	99
20 h	P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,086	0,061	0,985
	Anteil(%)	0	0	0	0	82	93	96	103

Gegen *Escherichia coli* ATCC 35218 zeigt Chitosan 85/15/A1 eine ähnliche Wirkung wie für *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 beschrieben (siehe Abbildungen 5.14 und 5.15 sowie Tabelle 5.10).

In den Konzentrationen 0,025 % bis 0,25 % wird eine Vermehrung der Bakterien verhindert, der signifikante Unterschied zur Kontrolle mit Puffer wird aus Tabelle 5.10 deutlich.

Die Wachstumskurve der Probe 0,01 % steigt hingegen nach acht Stunden an und erreicht maximal 30 % der Referenzkurve. Eine entsprechende Wachstumshemmung durch Chitosan 85/15/A1 wird deutlich.

Die Kurven der niedrigen Konzentrationen (0,001 % bis 0,005 %) nähern sich der Kontrolle mit Puffer an. Nach 20 Stunden zeigen die Konzentrationen 0,001 %, 0,0025 % und 0,005 % noch einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, die Kurven erreichen aber immerhin 85 % des Vergleichswertes. Die Wachstumskurven liegen sehr dicht beieinander, so dass eine Abstufung kaum möglich ist.

Die Konzentrationen, bei denen kein Bakterienwachstum erkennbar ist, zeigen bei der Verteilung der Einzelmesswerte die geringste Streuung. Dies kann sowohl bei *Escherichia coli* ATCC 35218 als auch bei *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 beobachtet werden.

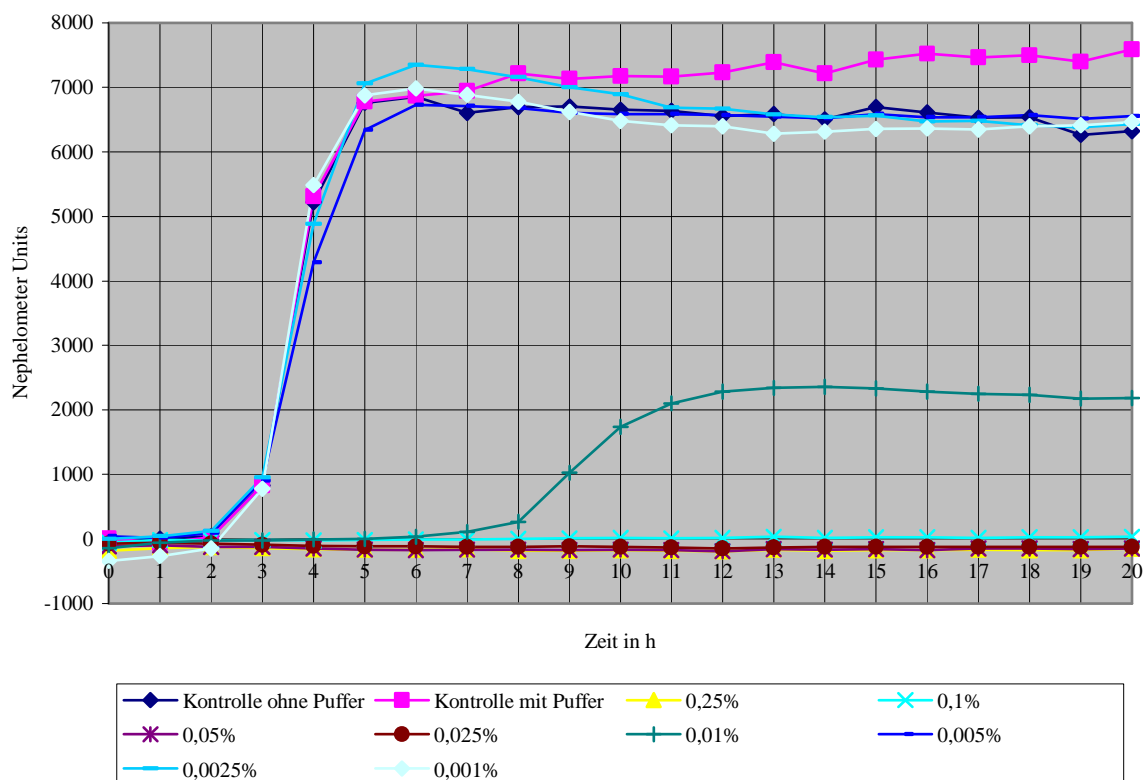


Abbildung 5.14: *Escherichia coli* ATCC 35218 mit Chitosan 85/15/A1

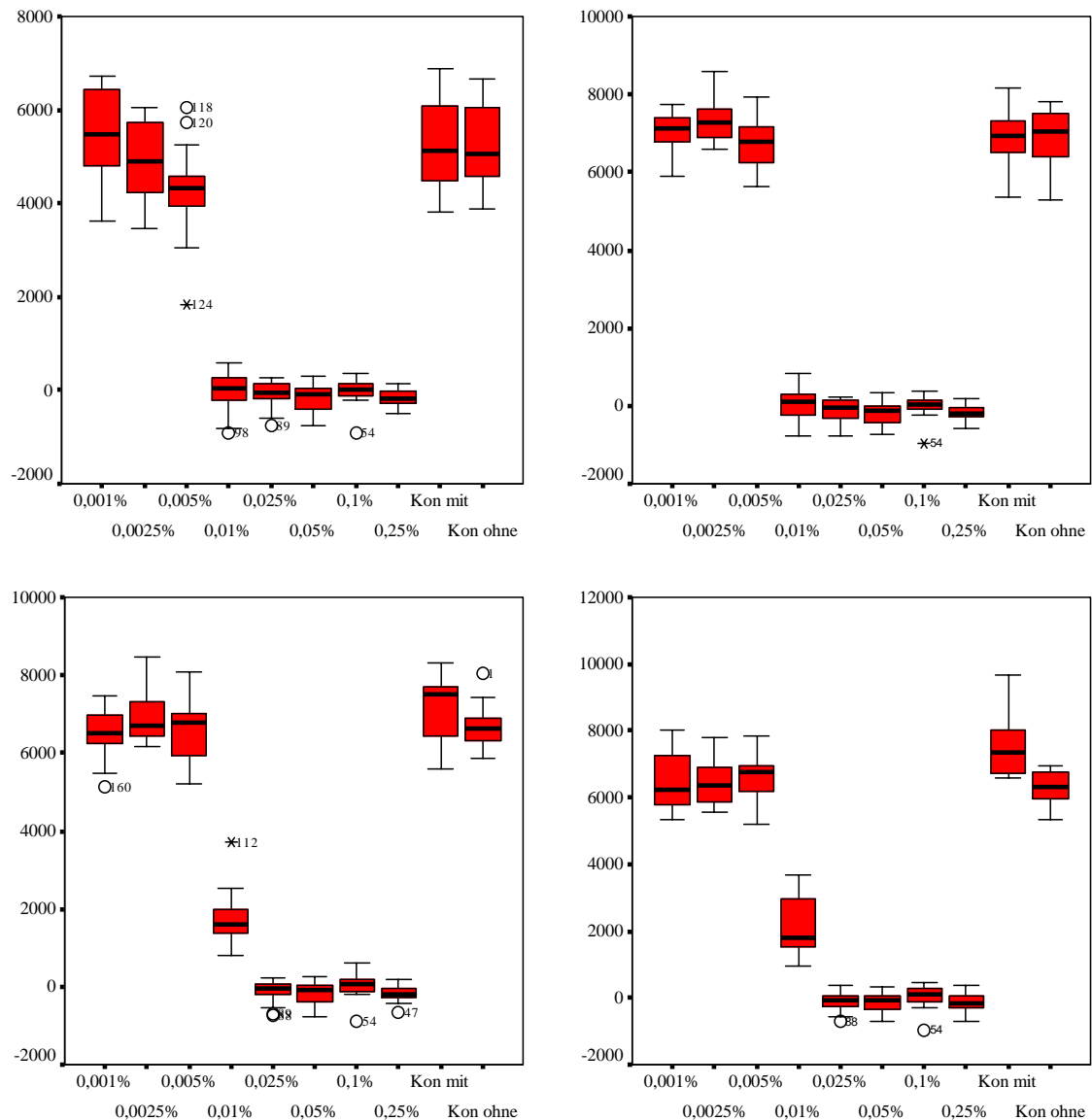


Abbildung 5.15: *Escherichia coli* ATCC 35218 mit Chitosan 85/15/A1, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts)

Tabelle 5.10: *Escherichia coli* ATCC 35218 mit Chitosan 85/15/A1, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit Puffer), signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt

		0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%	0,0025%	0,001%
4 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,007	0,007	0,224	0,515
	Anteil(%)	0	0	0	0	0	81	92	103
6 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,468	0,094	0,590
	Anteil(%)	0	0	0	0	1	98	107	102
10 h	P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,051	0,287	0,019
	Anteil(%)	0	0	0	0	24	92	96	90
20 h	P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,007	0,001	0,001
	Anteil(%)	0	0	0	0	29	86	85	85

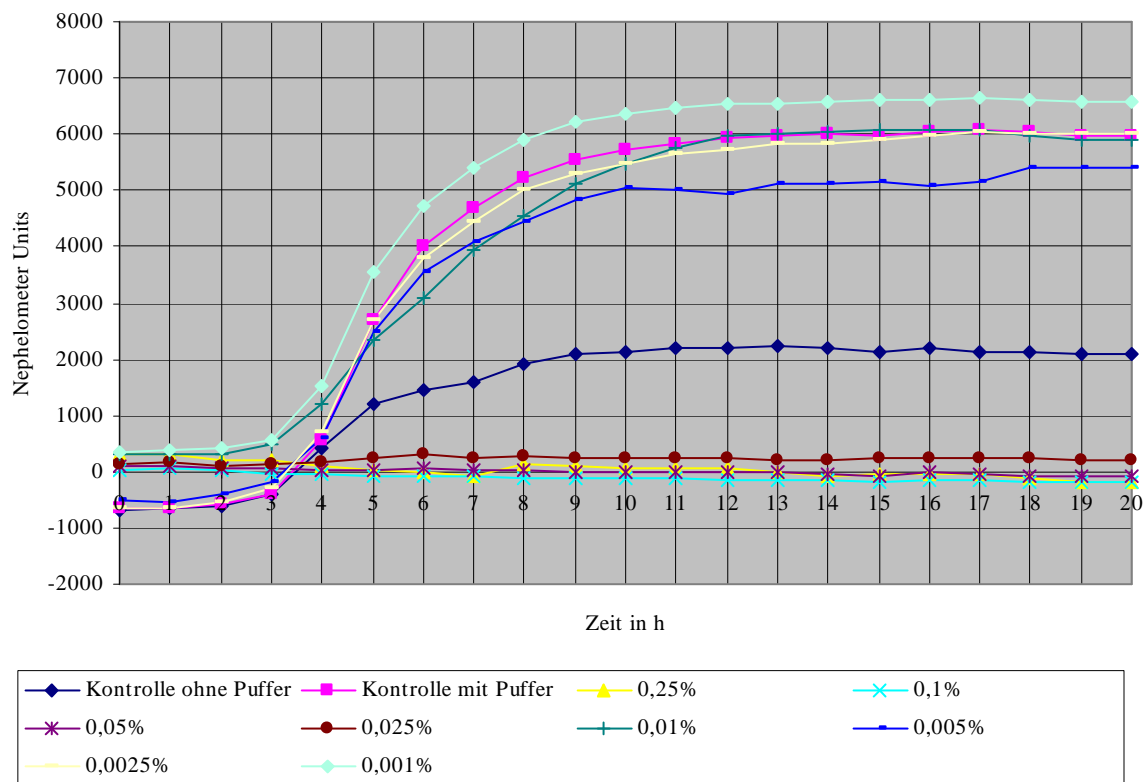
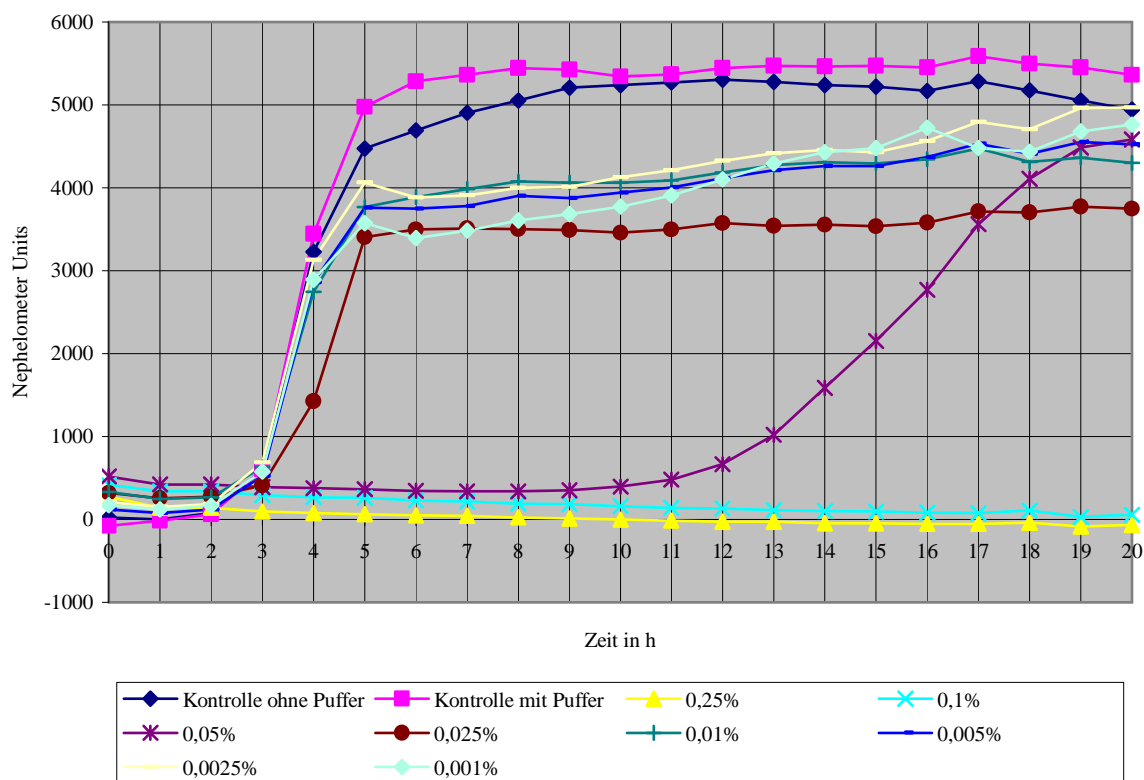
Chitosan 85/15/A1 wurde in gelöster Form bezogen (siehe Abschnitt 4.4.3). Nach Angaben des Herstellers wurde Essigsäure als Lösungsmittel verwendet. Es musste somit der Einfluss der Essigsäure auf das entsprechende Bakterienwachstum aufgeklärt werden.

Wie unter 4.7.3 beschrieben, wurde jeder Bakterienstamm bei verschiedenen Essigsäurekonzentrationen im Nephelometer gemessen, die erhaltenen Wachstumskurven sind in den Abbildungen 5.16 und 5.17 dargestellt.

Eine Keimvermehrung von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 wird durch Essigsäure in den Konzentrationen 0,025 % bis 0,25 % vollständig verhindert. Im Gegensatz hierzu führen die niedriger konzentrierten Proben zu keiner Wachstumshemmung. Dies gleicht den ermittelten Wachstumskurven für Chitosan 85/15/A1 (siehe Abbildung 5.12). Somit lässt sich für *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 feststellen, dass Essigsäure eine ähnliche Wachstumshemmung wie Chitosan 85/15/A1 erzielt.

Ähnliche Ergebnisse wurden für *Escherichia coli* ATCC 35218 ermittelt. In den Proben mit 0,1 %-iger und 0,25 %-iger Essigsäure konnte kein Anstieg der Trübungswerte verzeichnet werden. Jedoch ist ab 0,05 % ein Bakterienwachstum erkennbar, die Kurve beginnt nach 11 Stunden anzusteigen. Die niedrigeren Konzentrationen nähern sich dann der Kontrolle mit Puffer an. Im Vergleich hierzu findet bei Chitosan 85/15/A1 erst ab 0,01 % ein geringes Wachstum statt (siehe Abbildung 5.14). Insgesamt lässt sich für *Escherichia coli* ATCC 35218 eine stärkere Hemmung durch Chitosan 85/15/A1 erkennen. Essigsäure erzielt im Vergleich eine schwächere Wirkung, die Unterschiede fallen jedoch nur gering aus.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zumindest ein Teil der Wirkung von Chitosan 85/15/A1 auf das Lösungsmittel Essigsäure zurückzuführen ist. Da Chitosan 85/15/A1 nicht in ungelöster Form erhältlich ist, kann eine genaue Abgrenzung nicht vorgenommen werden.

Abbildung 5.16: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit EssigsäureAbbildung 5.17: *Escherichia coli* ATCC 35218 mit Essigsäure

5.9 Wirkung von Chitosan-oligosaccharid-lactat

Chitosan-oligosaccharid-lactat (MG: 5 kDa, Deacetylierungsgrad: > 90 %) zeigt eine geringere Wirkung auf *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 als die in den Abschnitten 5.6 bis 5.8 verwendeten Chitinderivate. Wie aus den Abbildungen 5.18 und 5.19 sowie Tabelle 5.11 ersichtlich, wird nur in hohen Konzentrationen eine Wachstumshemmung erreicht. Die Proben mit den Konzentrationen 0,25 % bis 2 % bleiben auf dem Ausgangsniveau, die Trübungswerte steigen nicht an. Die ermittelten Signifikanzwerte sind alle kleiner 0,001.

Niedrige Konzentrationen von Chitosan-oligosaccharid-lactat (0,005 % bis 0,1 %) sind nicht in der Lage eine Keimvermehrung zu verhindern.

Die Wachstumskurven 0,05 % und 0,1 % erreichen sogar deutlich höhere Trübungswerte als die entsprechende Kontrolle mit Puffer. Die genannten Lösungen scheinen das Bakterienwachstum zu fördern. Nach 10 bzw. 20 Stunden wird ein signifikanter Unterschied zur Referenz ermittelt. Die höchsten Trübungen erreicht 0,05%-iges Chitosan-oligosaccharid-lactat. Der prozentuale Anteil zur Kontrolle mit Puffer liegt nach 20 Stunden bei 112 %.

Mit abnehmender Konzentration (0,005 % bis 0,025 %) liegen die Kurven knapp unter der Referenz, nach 20 Stunden ist ein signifikanter Unterschied ersichtlich.

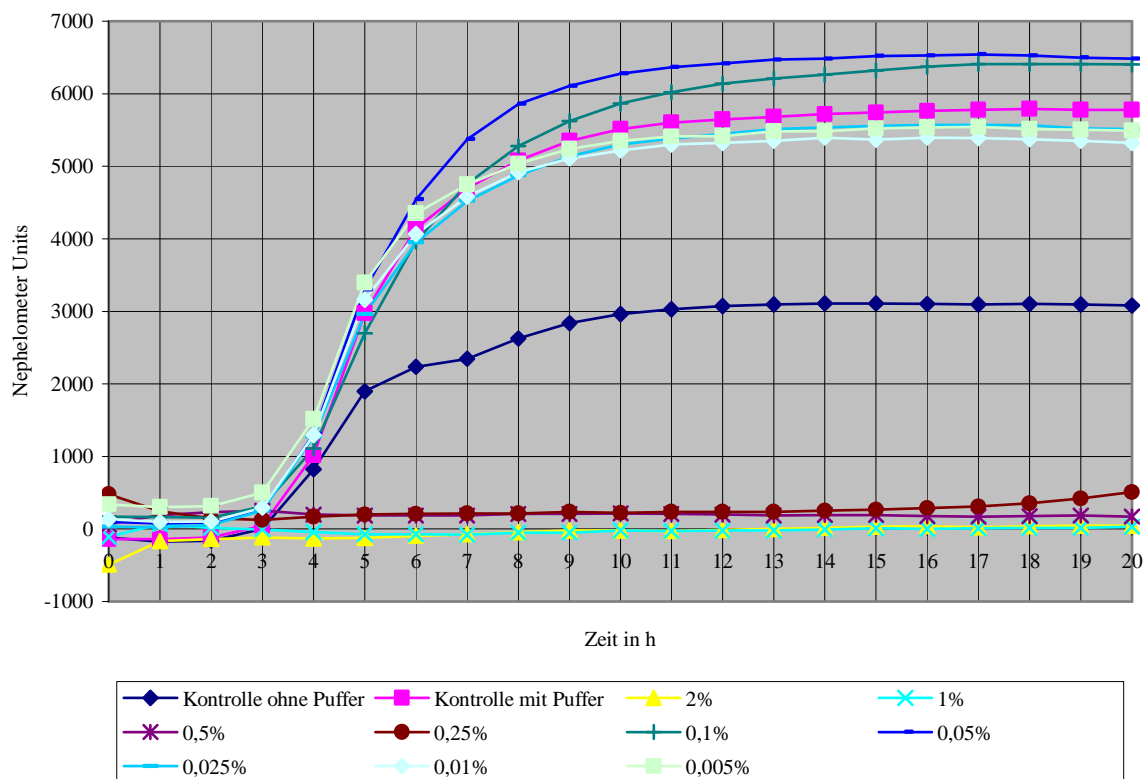


Abbildung 5.18: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan-oligosaccharid-lactat

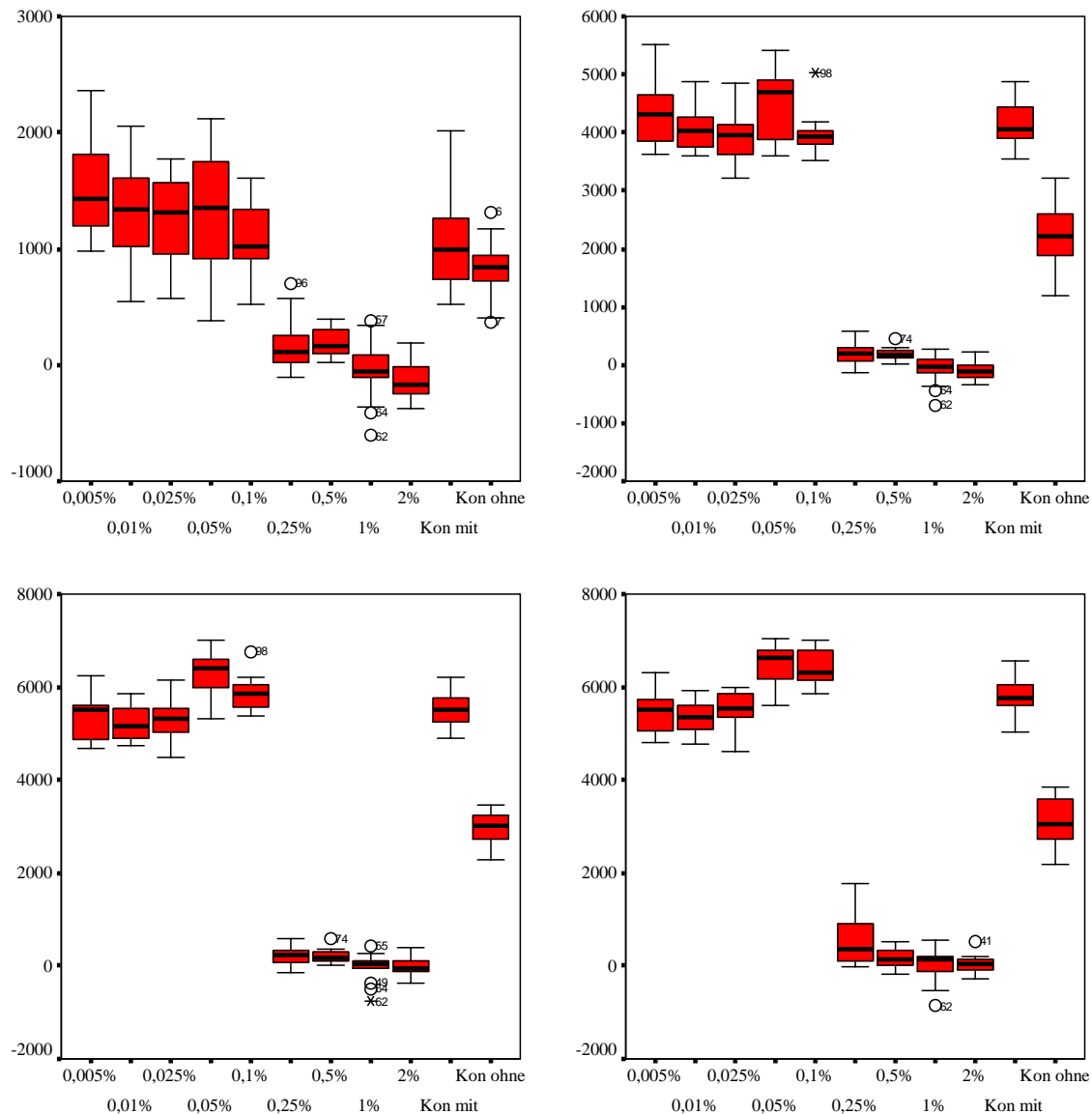


Abbildung 5.19: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan-oligosaccharid-lactat, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts)

Tabelle 5.11: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit Chitosan-oligosaccharid-lactat, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Kontrolle mit Puffer, signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt

		2%	1%	0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%
4 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,381	0,149	0,029	0,047	0,001
	Anteil(%)	0	0	19	17	109	129	125	127	149
6 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,094	0,039	0,210	0,669	0,381
	Anteil(%)	0	0	4	5	96	110	95	98	105
10 h	P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,015	<0,001	0,224	0,023	0,270
	Anteil(%)	0	0	4	4	106	114	96	95	97
20 h	P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,051	0,001	0,035
	Anteil(%)	1	1	3	9	111	112	95	92	95

Gegen *Escherichia coli* ATCC 35218 zeigt Chitosan-oligosaccharid-lactat nur eine geringe Wirkung. Die zugehörigen Wachstumskurven, Messwerteverteilungen und Signifikanzwerte werden in den Abbildungen 5.20 und 5.21 sowie Tabelle 5.12 dargestellt.

In hohen Konzentrationen (0,25 % bis 2 %) verhindert Chitosan-oligosaccharid-lactat vollständig die Vermehrung der verwendeten Keime. Dies wird auch aus den ermittelten Signifikanzwerten deutlich, die alle unter dem Wert 0,001 liegen. Die Wachstumskurven zeigen keinen Anstieg im Verlauf der Messungen.

Im Gegensatz hierzu steigen die Wachstumskurven der niedrigen Konzentrationen (0,005 % bis 0,1 %) deutlich an. Sie erreichen näherungsweise die Höhe der Referenzkontrolle. Die entsprechenden Signifikanzwerte unterstreichen diese Aussage. Mit Ausnahme der 4-Stunden-Werte der Proben 0,05 % und 0,025 % sowie der 10-Stunden-Werte für 0,01 % und 0,005 % ist kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle mit Puffer vorhanden.

Die Messwerteverteilung (siehe Abbildung 5.21) zeigt insbesondere nach 20 Stunden noch eine deutliche Streuung der Einzelwerte. Als Erklärung könnte ein Ausfallen von Chitosanteilchen in einzelnen Wells genannt werden. Somit könnte es zu Trübungsanstiegen einzelner Messungen sowie bestimmter Blanks kommen, die zur oben genannten Streuung führen.

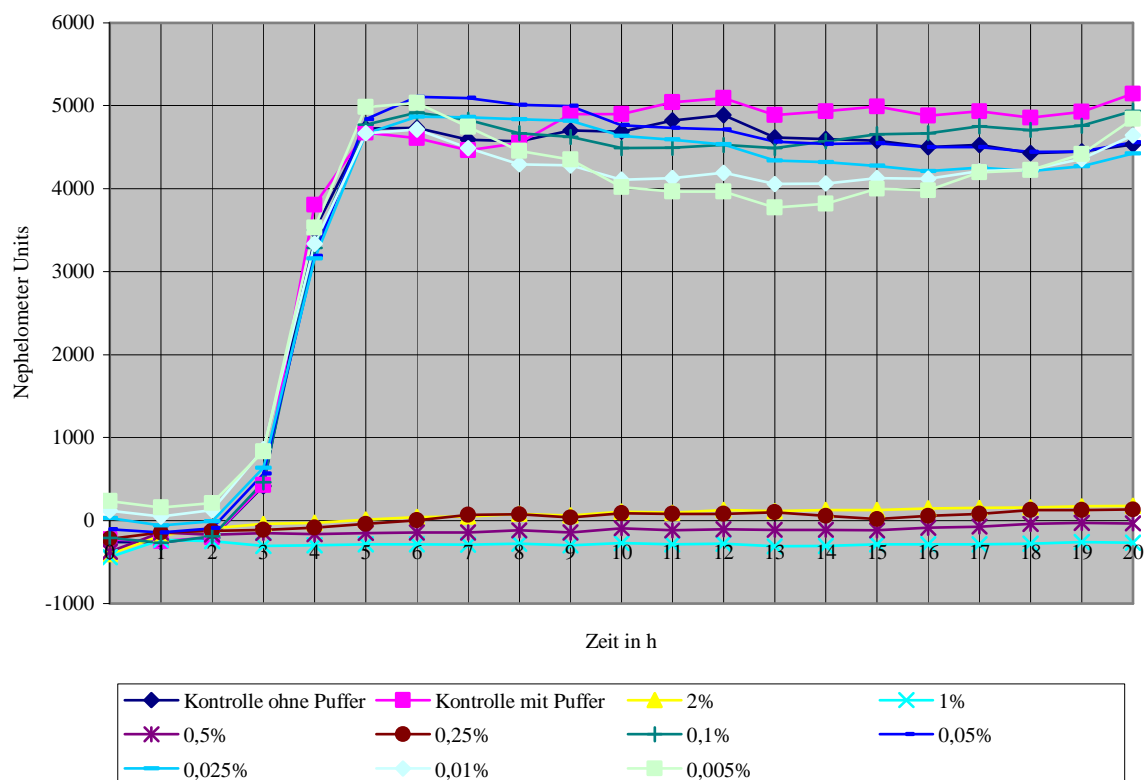


Abbildung 5.20: *Escherichia coli* ATCC 35218 mit Chitosan-oligosaccharid-lactat

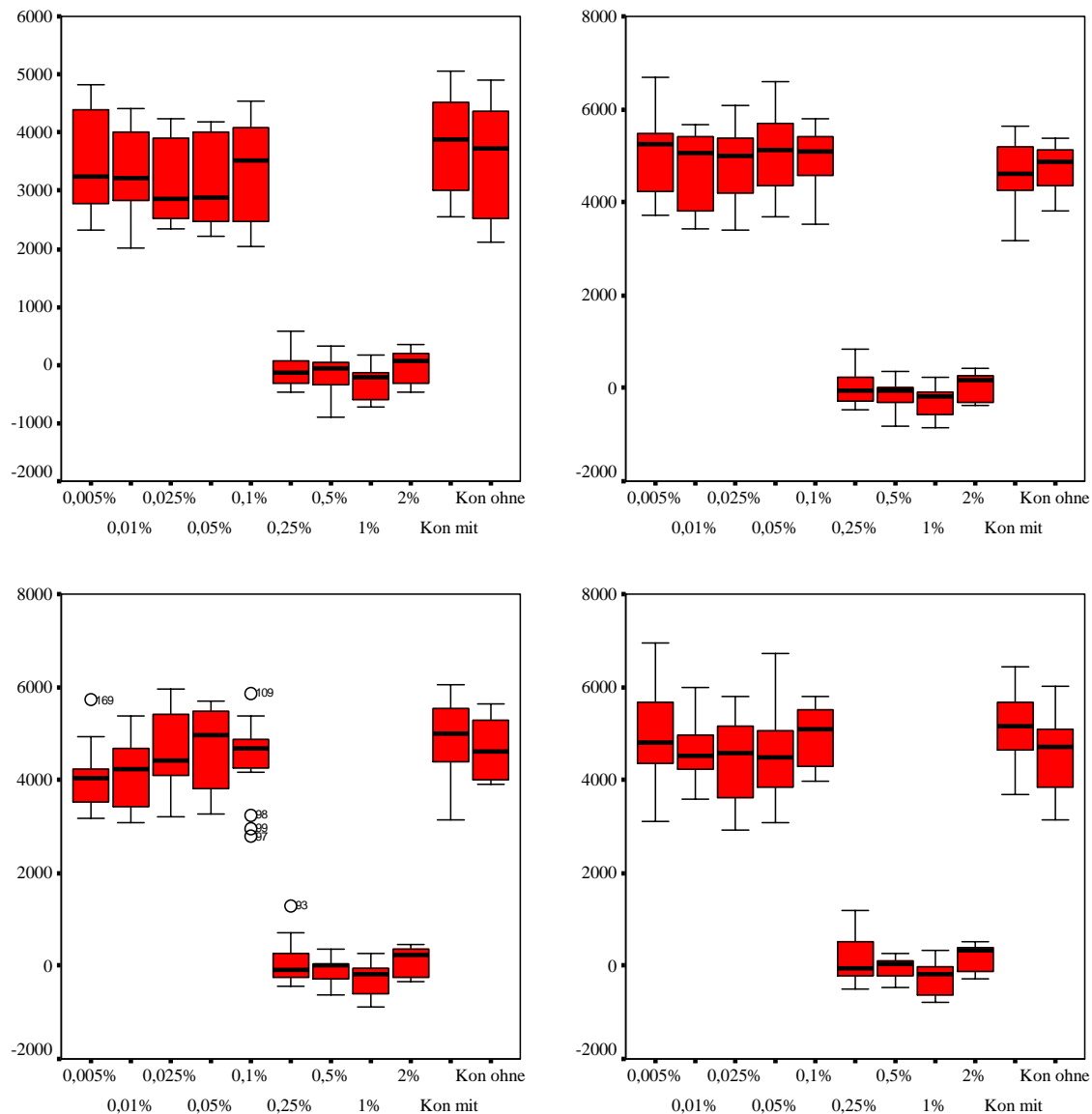


Abbildung 5.21: *Escherichia coli* ATCC 35218 mit Chitosan-oligosaccharid-lactat, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts)

Tabelle 5.12: *Escherichia coli* ATCC 35218 mit Chitosan-oligosaccharid-lactat, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Kontrolle mit Puffer, signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt

		2%	1%	0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%	0,01%	0,005%
4 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,067	0,015	0,017	0,067	0,423
	Anteil(%)	0	0	0	0	86	84	83	88	93
6 h	p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,196	0,094	0,381	0,590	0,160
	Anteil(%)	1	0	0	0	107	111	106	102	109
10 h	P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,160	0,642	0,361	0,004	0,002
	Anteil(%)	2	0	0	2	92	97	95	84	82
20 h	P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,515	0,067	0,056	0,051	0,361
	Anteil(%)	3	0	0	3	96	89	86	90	94

5.10 Wirkung von N-Acetyl-D-Glucosamin

Das Monomer von Chitin und der davon abgeleiteten Chitosane, N-Acetyl-D-Glucosamin (MG: 221,21 Da), verursacht in den hier verwendeten Konzentrationen keine Wachstumshemmung von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Die entsprechenden Wachstumskurven, Messwerteverteilungen und Signifikanzwerte zeigen die Abbildungen 5.22 und 5.23 sowie Tabelle 5.13.

Die Wachstumskurven der Proben mit den höchsten Konzentrationen (8 % und 4 %) liegen knapp über der Kontrolle mit Puffer. Nach 20 Stunden erreichen sie 103 % bzw. 102 % der Referenz. Die niedrigen Konzentrationen (0,025 % bis 0,25 %) kommen hingegen nur auf 90 % bis 94 % der Kontrolle. In hohen Konzentrationen scheint N-Acetyl-D-Glucosamin die Keimvermehrung von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 zu fördern.

Jedoch lässt sich diese Aussage nicht durch den Mann-Whitney-U-Test beweisen. Mit Ausnahme des 4-Stunden Wertes der Probe 8 % zeigt keine Konzentration signifikante Unterschiede zur Referenzkontrolle. Schlussfolgernd lässt sich zumindest feststellen, dass N-Acetyl-D-Glucosamin keine Hemmung des Bakterienwachstums erzielt.

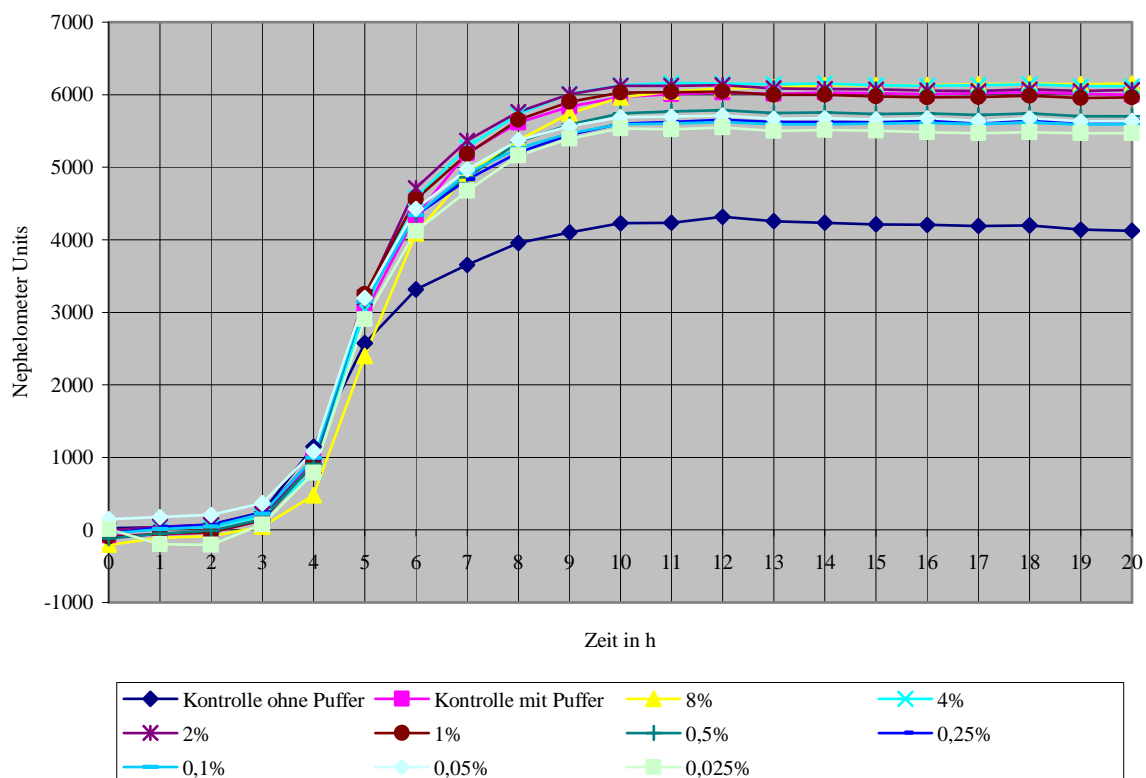


Abbildung 5.22: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit N-Acetyl-D-Glucosamin

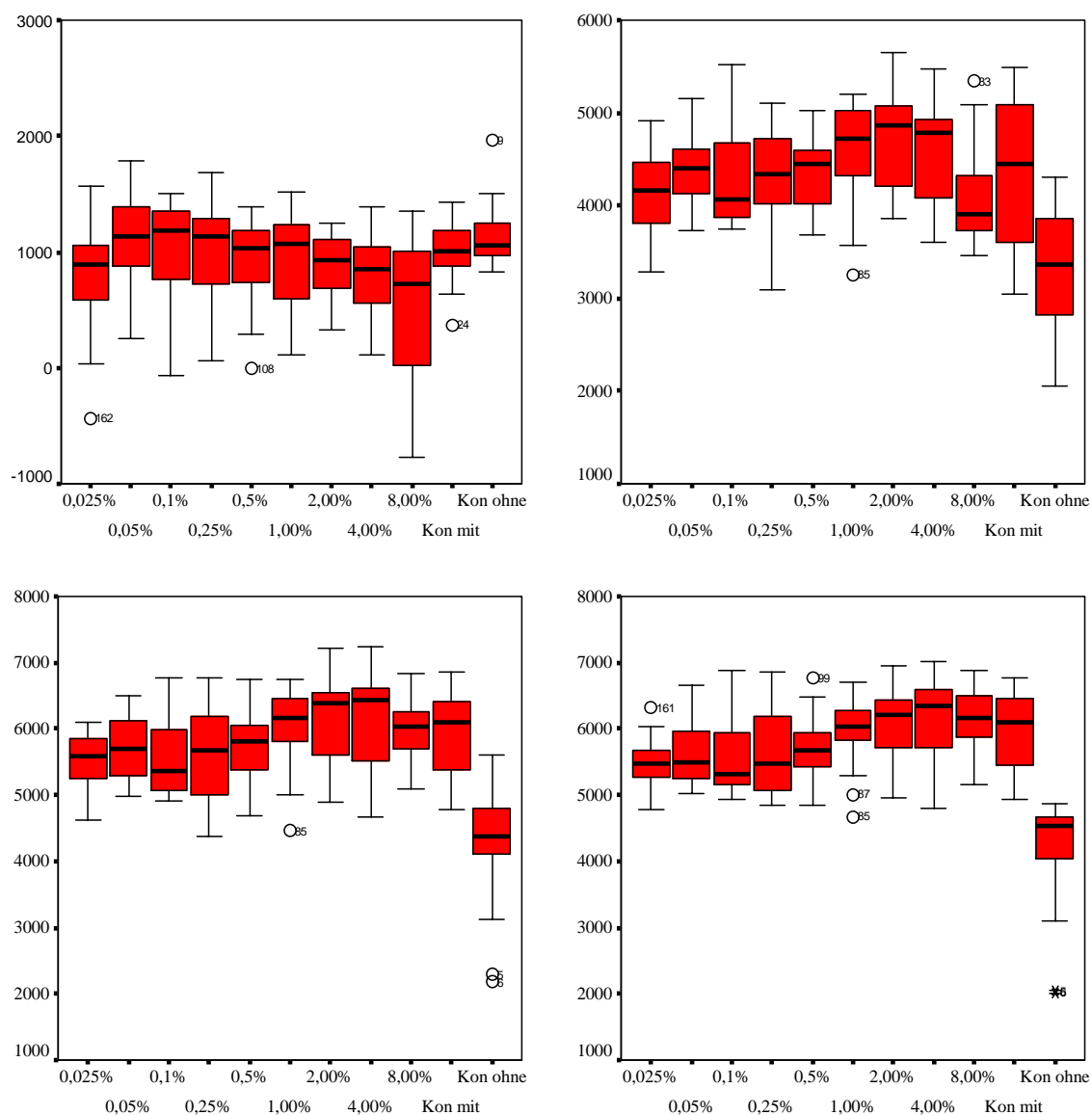


Abbildung 5.23: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit N-Acetyl-D-Glucosamin, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts)

Tabelle 5.13: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mit N-Acetyl-D-Glucosamin, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Kontrolle mit Puffer, signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt

		8%	4%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%
4 h	p	0,015	0,160	0,305	0,926	0,809	0,539	0,445	0,287	0,341
	Anteil(%)	48	81	89	92	92	100	100	109	79
6 h	p	0,616	0,564	0,196	0,590	0,897	0,956	0,724	0,897	0,402
	Anteil(%)	94	105	109	105	100	100	100	102	95
10 h	P	0,752	0,270	0,402	0,752	0,171	0,171	0,073	0,138	0,056
	Anteil(%)	100	103	103	101	96	94	94	95	93
20 h	P	0,515	0,669	0,897	0,867	0,171	0,128	0,128	0,119	0,052
	Anteil(%)	103	102	101	99	95	94	93	94	91

N-Acetyl-D-Glucosamin zeigt auf *Escherichia coli* ATCC 35218 nur eine geringe Wirkung (siehe Abbildung 5.24 und 5.25 sowie Tabelle 5.14).

Lediglich die mit 8 %-igem N-Acetyl-D-Glucosamin bestückte Probe zeigt nach 20 Stunden einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle mit Puffer. Die entsprechende Wachstumskurve erreicht maximal 89 % der Referenz (20-Stunden-Wert). Es lässt sich eine geringe Wachstumshemmung erkennen.

Die niedriger konzentrierten Proben liegen annähernd im Bereich der Referenz. Mit Ausnahme des 10-Stunden Wertes von 0,05 % und des 4-Stunden Wertes von 4 % sind alle Signifikanzwerte größer 0,05. Es liegen somit keine signifikanten Unterschiede zur Referenz vor. Die höchsten Trübungswerte erreichen die Proben 0,025 % und 0,05 %. Sie liegen knapp über der Kontrolle mit Puffer.

Die Streuung der Einzelwerte (Abbildung 4.25) nimmt mit steigender Zeit zu. Einige Wells erreichen nur ein geringes Wachstum während andere Messwerte bis zu 2000 Nephelometer Units (relative Einheiten) höher liegen. Dies zeigt sich bei allen verwendeten Konzentrationen.

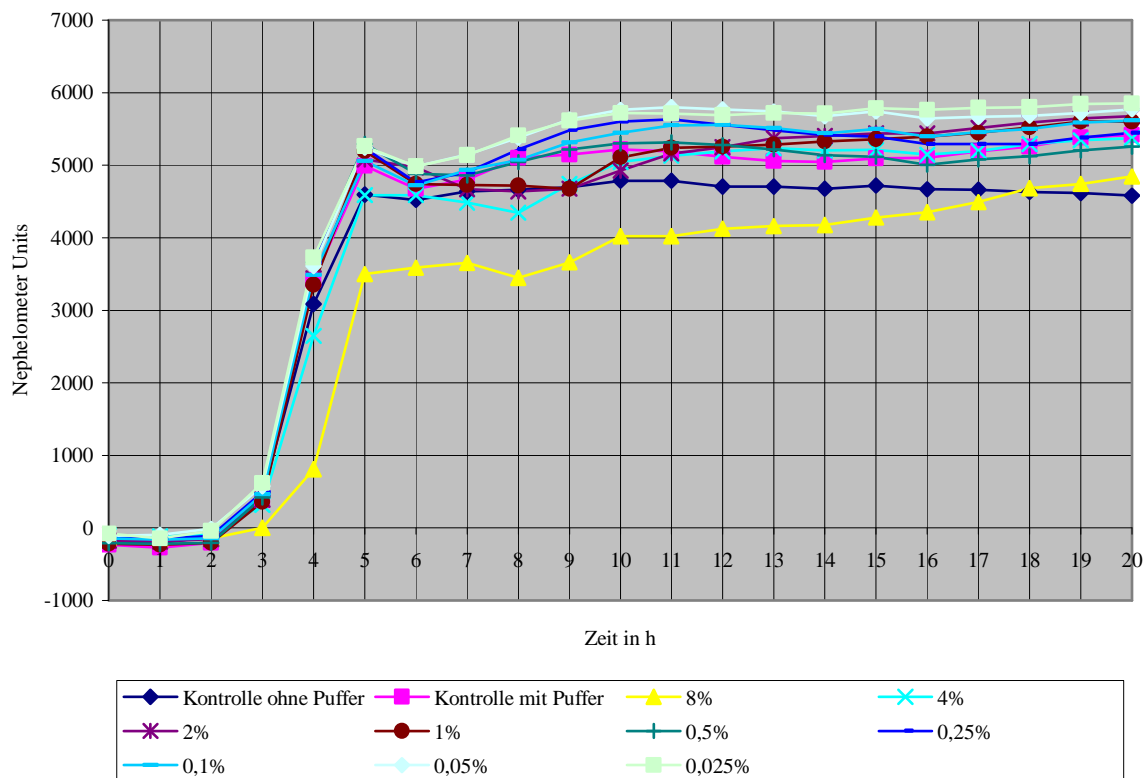


Abbildung 5.24: *Escherichia coli* ATCC 35218 mit N-Acetyl-D-Glucosamin

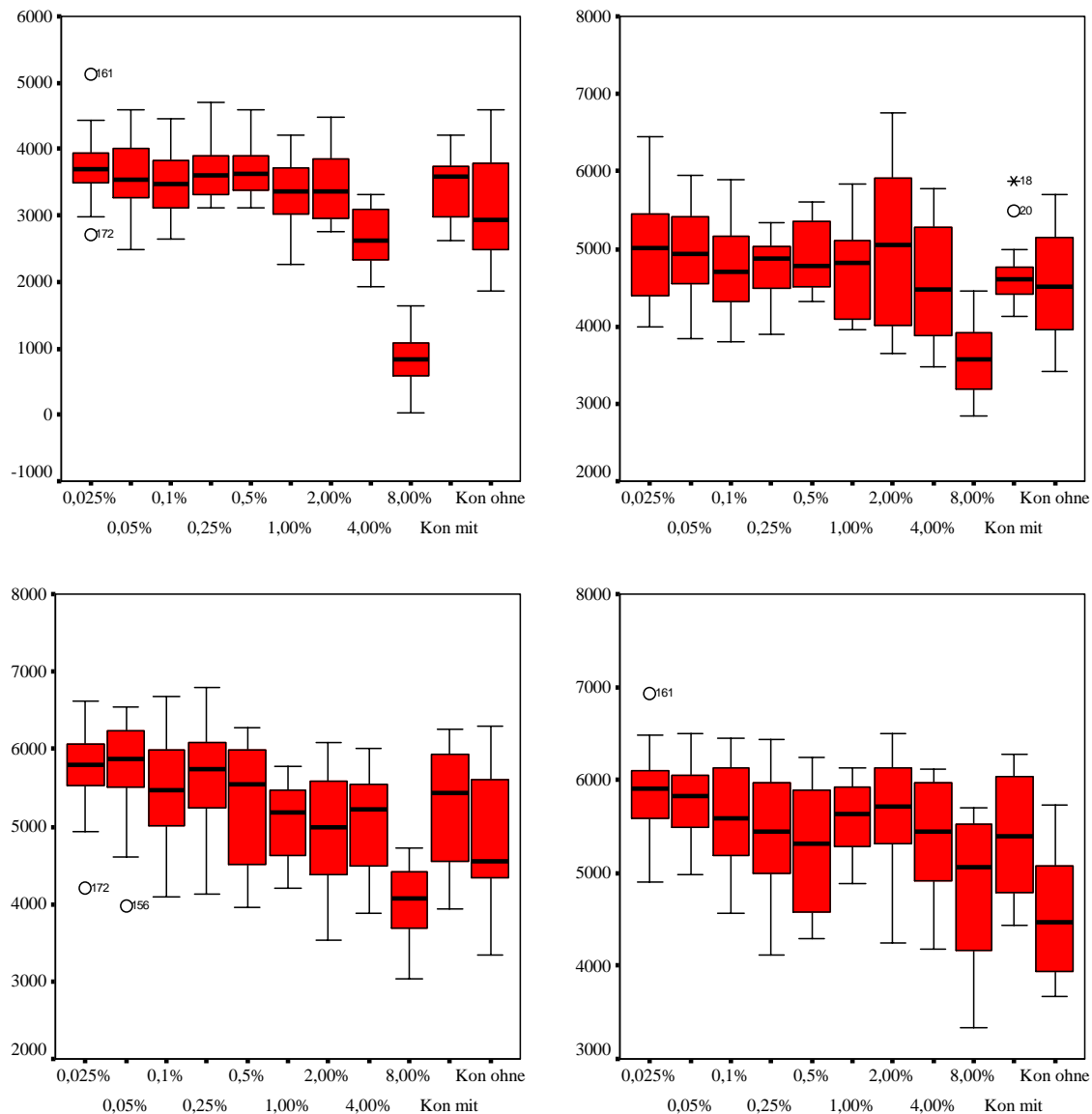


Abbildung 5.25: *Escherichia coli* ATCC 35218 mit N-Acetyl-D-Glucosamin, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts)

Tabelle 5.14: *Escherichia coli* ATCC 35218 mit N-Acetyl-D-Glucosamin, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit Puffer), signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt

		8%	4%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,1%	0,05%	0,025%
4 h	p	<0,001	<0,001	0,897	0,642	0,305	0,341	0,956	0,564	0,119
	Anteil(%)	24	77	101	98	107	107	102	106	109
6 h	p	<0,001	0,642	0,752	0,867	0,224	0,270	0,867	0,080	0,224
	Anteil(%)	77	98	106	101	105	102	101	107	107
10 h	P	<0,001	0,445	0,254	0,515	0,539	0,138	0,491	0,039	0,073
	Anteil(%)	77	97	94	98	102	107	104	111	110
20 h	P	0,026	0,809	0,361	0,564	0,445	0,724	0,323	0,171	0,128
	Anteil(%)	89	99	105	103	97	101	104	107	108

5.11 pH-Messung

Wie unter 4.7.5 beschrieben, wurden die pH-Werte vor und nach den Messungen mit Hilfe von Universalindikatorpapier bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse werden zusammen dargestellt, da keine Unterschiede zwischen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia coli* ATCC 35218 gefunden wurde. In Tabelle 5.15 sind die pH-Werte vor den Messungen dargestellt. Da die Trockensubstanzen in 0,01 M PBS gelöst wurden (siehe 4.7.1), starteten die Messreihen im neutralen bis schwach sauren Bereich. In Abhängigkeit von der Chitosankonzentration in den Wells wurden pH-Werte von 6 beziehungsweise 7 gemessen. Einzige Ausnahme stellt hierbei Chitosan 85/15/A1 dar, welches vom Hersteller bereits in 1%-iger Essigsäure gelöst wurde. Für die Konzentrationen 0,1 % und 0,25 % ergab sich somit ein pH-Wert von 5.

Tabelle 5.15: pH-Werte vor den Messungen

Konzentration in %	8	4	2	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001
Chitosan 1130	-	-	-	-	6	7	7	7	7	7	7	7	7
Chitosan HCl	-	-	-	-	6	7	7	7	7	7	7	7	7
Chitosan 85/15/A1	-	-	-	-	-	5	5	6	7	7	7	7	7
Oligomer	-	-	6	6	6	7	7	7	7	7	7	-	-
Monomer	7	7	7	7	7	7	7	7	7	-	-	-	-

Tabelle 5.16 zeigt die pH-Werte, die nach den Messungen ermittelt wurden. In den Wells, in denen ein Bakterienwachstum stattgefunden hatte, waren die pH-Werte deutlich abgefallen. Dies lässt sich durch den Stoffwechsel der Bakterien erklären. Bei der Umsetzung der Nährbouillon wurden Säuren durch die Mikroorganismen gebildet. Daher wurden insbesondere in den Wells mit geringen Chitosankonzentrationen, die entsprechend starkes Bakterienwachstum zeigten, niedrige pH-Werte gefunden. Als Ausnahme sind hierbei die Proben mit N-Acetyl-D-Glucosamin (Monomer) zu betrachten, da auch durch hohe Konzentrationen ein Bakterienwachstum nicht verhindert werden konnte. Somit fiel in allen Wells der pH-Wert deutlich ab. Es wurden jedoch in keiner Probe pH-Werte unter 5 gefunden.

Tabelle 5.16: pH-Werte nach den Messungen

Konzentration in %	8	4	2	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001
Chitosan 1130	-	-	-	-	6	7	7	7	6	5	5	5	5
Chitosan HCl	-	-	-	-	6	7	7	6	6	5	5	5	5
Chitosan 85/15/A1	-	-	-	-	-	5	5	6	7	5	5	5	5
Oligomer	-	-	6	6	6	7	5	5	5	5	5	-	-
Monomer	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	-	-	-

Bei allen Messreihen wurde eine Kontrolle ohne Puffer mitgeführt. Wie unter 4.7.3 beschrieben, wurde hier statt PBS isotonische Kochsalzlösung verwendet. In den erhaltenen Kurven zeigt sich somit die pH-Abhängigkeit des Bakterienwachstums. Die Proben mit *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 steigen nicht auf das Niveau der entsprechenden Referenz (Kontrolle mit Puffer). Es werden deutlich geringere Trübungswerte erreicht. Im Gegensatz hierzu liegen die erhaltenen Wachstumskurven für *Escherichia coli* ATCC 35218 zumeist nur knapp unter der Kontrolle.

Es kann somit geschlussfolgert werden, dass die Vermehrung von *Staphylococcus aureus* im stärkeren Maße durch den pH-Wert beeinflusst wird. Das Wachstum von *Escherichia coli* wird hingegen nur gering vermindert.

5.12 Bakterienanzucht nach den Messungen

Nach Abschluss der Messungen wurde der Inhalt der Wells, welche kein Bakterienwachstum im Nephelometer zeigten, auf Agarplatten gebracht (siehe 4.7.6). Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C konnte die Entstehung von Bakterienkolonien beurteilt werden. Auf diese Weise sollte kontrolliert werden, ob die entsprechenden Chitosanderivate eine vollständige Abtötung oder eine reversible Hemmung der Mikroorganismen verursachen.

Für Chitosan 1130 und Chitosan-HCl kamen die Konzentrationen 0,05 % bis 0,5 % zur Anwendung. Bei den Konzentrationen 0,1 % bis 0,5 % konnte kein Koloniewachstum für *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia coli* ATCC 35218 gefunden werden. Lediglich die Proben mit der Konzentration 0,05 % zeigten in etwa der Hälfte der Fälle ein Bakterienwachstum auf den Agarplatten. Chitosan 1130 und Chitosan-HCl erzielten somit in den hohen Konzentrationen eine vollständige Abtötung der verwendeten Mikroorganismen. Aus den Messungen mit Chitosan 85/15/A1 wurden die Proben 0,025 % bis 0,25 % ausgewählt. Interessanterweise konnten bei allen Konzentrationen Bakterienkolonien auf den Platten nachgewiesen werden.

Ähnliche Ergebnisse wurden für Chitosan-oligosaccharid-lactat gefunden. Alle verwendeten Proben (0,25 % bis 2 %) zeigten ein deutliches Bakterienwachstum nach entsprechender Inkubation im Brutschrank.

Für N-Acetyl-D-Glucosamin wurde keine Anzucht auf Agarplatten vorgenommen, da während der Messungen im Nephelometer keine Wachstumshemmung der Bakterien festgestellt wurde.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in den verwendeten Konzentrationen lediglich Chitosan 1130 und Chitosan-HCl eine vollständige Abtötung der Bakterien erzielten. Ein bakterizider Effekt dieser Substanzen wird deutlich.

5.13 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse als kurze Übersicht zusammengefasst werden. Chitosan 1130, die Substanz mit dem höchsten Molekulargewicht (MG: 120 kDa) in dieser Arbeit, erzielte die stärkste Wachstumshemmung von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia coli* ATCC 35218. In den Konzentrationen 0,1 %, 0,25 % und 0,5 % zeigte Chitosan 1130 einen bakteriziden Effekt auf beide Bakterienstämme. Nach den Messungen konnten in diesen Proben keine lebenden Keime nachgewiesen werden.

Chitosan-HCl (MG: 30 kDa) erzielte ähnliche Ergebnisse wie Chitosan 1130, in hohen Konzentration (0,1 % bis 0,5 %) konnte eine vollständige Abtötung der Bakterien erzielt werden. Jedoch zeigte Chitosan-HCL in niedrigen Konzentrationen eine etwas schwächere Wirkung wie Chitosan 1130. Die dargestellten Ergebnisse für *Escherichia coli* ATCC 35218 zeigen die höhere antibakterielle Potenz von Chitosan 1130. Beide Substanzen besitzen einen ähnlichen Deacetylierungsgrad. Das Molekulargewicht scheint somit für die unterschiedlich starke Wirkung verantwortlich zu sein.

Chitosan 85/15/A1 (MG: 30-50 kDa) erzielte ebenfalls eine Wachstumshemmung beider Bakterienstämme. In den Konzentrationen 0,025 % bis 0,25 % wurde eine Vermehrung der Keime verhindert. Es wurde jedoch keine vollständige Abtötung der Bakterien erreicht, aus allen Proben konnten überlebende Keime isoliert und angezüchtet werden. Auch konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Wirkung auf das Lösungsmittel Essigsäure zurückzuführen ist.

Chitosan-oligosaccharid-lactat (MG: 5 kDa) zeigte nur eine geringe Wirkung. Es wurde nur in hohen Konzentrationen (0,25 % bis 2 %) eine Wachstumshemmung von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia coli* ATCC 35218 erzielt. Die Wachstumskurven der Proben 0,001 % bis 0,1 % lagen im Bereich der entsprechenden Referenz, manche erreichten sogar höhere Trübungswerte. In allen Proben konnten überlebende Keime gefunden werden.

Das Monomer der Chitosane, N-Acetyl-D-Glucosamin (MG: 221,21 Da), verursachte in den verwendeten Konzentrationen keine nennenswerte Wachstumshemmung von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia coli* ATCC 35218. Nur die Probe mit der Konzentration 8 % erzielte eine minimale Wirkung auf *Escherichia coli* ATCC 35218.

6 Diskussion

6.1 Die antibakterielle Wirkung von Chitosanen in Abhängigkeit von der Molekularstruktur und abiotischen Faktoren

Chitosane werden als Makromoleküle durch ihr Molekulargewicht und ihren Deacetylierungsgrad charakterisiert. In dieser Arbeit wurden Chitosane mit unterschiedlichen Molekulargewichten verwendet. Die Substanzen hatten alle einen ähnlichen Deacetylierungsgrad (85 % bis 87 %), lediglich Chitosan-oligosaccharid-lactat erzielte einen höheren Wert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung verschiedener Chitosanderivate mit unterschiedlichem Molekulargewicht auf *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia coli* ATCC 35218 bestimmt.

Chitosan 1130, mit 120 kDa das größte verwendete Molekül, erzielte für beide Bakterienstämme eine deutliche Wachstumshemmung. In den Konzentrationen 0,1 % bis 0,5 % konnte ein bakterizider Effekt nachgewiesen werden. Chitosan-HCl, mit einem deutlich geringeren Molekulargewicht (30 kDa), erzielte ähnliche Ergebnisse. Die Wachstumshemmung der Keime fiel nur geringfügig schwächer aus, ein bakterizider Effekt konnte gezeigt werden. Chitosan 85/15/A1 (30-50 kDa) konnte ebenfalls die Vermehrung der Bakterien verhindern, jedoch konnten nach den Messungen in allen Proben überlebende Keime nachgewiesen werden. Das verwendete Oligomer (Chitosan-oligosaccharid-lactat) beeinflusste hingegen nur in hohen Konzentrationen (0,25 % bis 2 %) das Bakterienwachstum, in niedrigerer Dosierung konnte keine Hemmung beobachtet werden. N-Acetyl-D-Glucosamin, das Monomer der Chitosane, blieb sogar wirkungslos. Es konnte keine nennenswerten Ergebnisse erzielen. Es wird deutlich, dass die antibakterielle Wirkung der Chitosanderivate an das Molekulargewicht geknüpft ist.

No et al. (2002) erzielten in ihrer Studie ähnliche Ergebnisse. Sie untersuchten die antibakteriellen Eigenschaften von sechs Chitosanen und sechs Chitosan-Oligomeren, die Molekulargewichte der verwendeten Substanzen reichten von 1 kDa bis 1671 kDa. Es wurden gramnegative und grampositive Bakterien, unter anderem auch *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*, verwendet. Die Chitosane erzielten eindeutig stärkere bakterizide Effekte als die Oligomere, dabei entwickelten die Substanzen mit einem Molekulargewicht von 470 kDa bzw. 746 kDa die höchste Aktivität. Chitosane mit ähnlichem Molekulargewicht wie Chitosan 1130, Chitosan-HCl oder Chitosan 85/15/A1 führten ebenfalls zu einer deutlichen Wachstumshemmung. Leider wurden keine Angaben zum Deacetylierungsgrad der verschiedenen Polymere gemacht, so dass in diesem Bezug ein Vergleich nicht möglich ist.

Tsai et al. (2004) stellten Oligomere und Chitosanoligosaccharide mit kleinen Molekülgrößen durch enzymatische Hydrolyse von Chitosan her. Es zeigte sich, dass die Ausgangssubstanz eine stärkere antibakterielle Aktivität entwickelte als die gebildeten Stoffe. Chitosane mit höherem Molekulargewicht erzielten, vergleichbar den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen, eine bessere Wirkung.

Im Gegensatz hierzu fanden Kittur et al. (2005) und Kumar et al. (2007) eine stärkere Wachstumshemmung von *Escherichia coli* durch ein Gemisch von Chitosanoligosacchariden und niedermolekularen Chitosanen als durch natives Chitosan.

Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse liefern Rhoades und Roller (2000). Sie produzierten durch Hydrolyse von nativen Chitosan verschiedene kleinere Molekülgrößen. Bei der folgenden antimikrobiellen Untersuchung stellte sich heraus, dass die größeren Derivate etwas bessere Eigenschaften als die Ausgangssubstanz hatten. Sehr kleine Molekülgrößen blieben hingegen wirkungslos. Es zeigte sich, dass durch milde Hydrolyse aktive niedrigmolekulare Chitosane gebildet werden können. Intensivere Aufspaltung des Ausgangschitosans führte indes zu inaktiven Oligomeren. Es ist somit denkbar, dass die widersprüchlichen Ergebnisse oben genannter Autoren durch unterschiedlich starke Hydrolyse der Ausgangssubstanzen verursacht sind.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei allen Studien, Chitosane mit mittlerem Molekulargewicht eine gute antibakterielle Wirkung gegen die verwendeten Bakterienstämme erzielten. Rabea et al. (2003) geben „effektive“ Größen von 10 bis 100 kDa an. Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen Chitosan 1130, Chitosan-HCl und Chitosan 85/15/A1 können in diese Gruppe eingeordnet werden. Chitosan-Oligomere, hier Chitosan-oligosaccharid-lactat, erzielten hingegen deutlich schwächere Ergebnisse.

Der Deacetylierungsgrad von Chitosanen hat ebenfalls einen Einfluss auf deren antibakterielle Eigenschaften, er umschreibt den Anteil von 2-Amino-2-desoxy- β -D-glucopyranose-Einheiten im Molekül. Chitosane mit einem hohen Deacetylierungsgrad können hierbei eine höhere Aktivität erzielen (Chen et al. 2002, Chung et al 2004, Jumaa et al 2002).

Eine Substanz mit einem Deacetylierungsgrad von 92 % verursachte eine wesentlich stärkere Wachstumshemmung von *Staphylococcus aureus* als ein weniger deacetyliertes (73 %) Chitosan (Jumaa et al. 2002). Chung et al. (2004) berichten über vergleichbare Ergebnisse für *Escherichia coli*, sie testeten Chitosane mit einem Deacetylierungsgrad von 75 % und 95 %. Chitosan 1130, Chitosan-HCl und Chitosan 85/15/A1 liegen mit ihren Werten zwischen 85 % und 87 %, sie zeigten bessere antibakterielle Eigenschaften als das stärker deacetylierte Chitosan-oligosaccharid-lactat (Deacetylierungsgrad > 90 %). Es kann geschlussfolgert

werden, dass - in Bezug auf die antimikrobielle Wirkung - das Molekulargewicht einen stärkeren Einfluss als der Deacetylierungsgrad hat.

Eine Erklärung für die stärkere Wirkung von Chitosanen mit hohem Deacetylierungsgrad ist in der Molekülstruktur zu suchen. Mit einem höheren Anteil von 2-Amino-2-desoxy- β -D-glucopyranose-Einheiten (Glucosamin) im Molekül sind auch mehr protonierbare Aminoruppen ($-\text{NH}_2$) vorhanden. Durch Bindung von Wasserstoffatomen erhalten diese eine positive Ladung ($-\text{NH}_3^+$). Chitosane mit einem hohen Deacetylierungsgrad sind somit stärkere Kationen. Sie können sich deshalb besser an anionische Moleküle auf der Zelloberfläche von Mikroorganismen binden und ihre Wirkung entfalten (Jumaa et al. 2002, Rabea et al. 2003).

In diesem Zusammenhang ist auch der Einfluss des pH-Wertes auf die antibakteriellen Eigenschaften von Chitosan zu betrachten. Mit sinkendem pH-Wert stehen mehr Protonen zur Verfügung, welche sich an die Chitosanmoleküle binden können (Tsai und Su 1999). Chung et al. (2003) geben einen pK-Wert von 6 für Chitosane an. Bei einem niedrigerem pH-Wert liegt somit die Mehrzahl der Aminogruppen in protonierter Form vor. Neben der verbesserten Bindung an anionische Moleküle wird hierdurch auch die Löslichkeit der Chitosane erhöht.

Chung et al. (2003) erzielten in ihrer Studie bei einem pH-Wert von 3 die stärkste Wachstumshemmung von *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*. Im basischen Bereich war das verwendete Chitosan fast wirkungslos. In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen Messungen im neutralen bis schwach sauren Bereich durchgeführt (siehe 5.11). Auch am Ende der Messreihen konnte kein pH-Wert unter 5 in den Proben gefunden werden. Es kann somit vermutet werden, dass die getesteten Substanzen im sauren Bereich eine stärkere Wirkung erzielen könnten. Durch Absenken des pH-Wertes wäre eine Verbesserung der antibakteriellen Eigenschaften möglich.

Die Wirkung von Chitosan kann durch das Lösungsmittel beeinflusst werden. Organische Säuren zeigen hierbei vorteilhafte Eigenschaften gegenüber Anorganischen. Sie sind in der Lage eine bakterizide Wirkung zu erzielen, während Letztgenannte nur als Protonendonator für die Chitosanmoleküle fungieren (Chung et al. 2003). Chitosan 85/15/A1 wurde vom Hersteller in gelöster Form bezogen. Es wurde Essigsäure als Lösungsmittel verwendet (siehe 4.4.3). Wie unter 5.8 beschrieben, zeigte Essigsäure in den verwendeten Konzentrationen eine hemmende Wirkung auf *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia coli* ATCC 35218. Ein Teil der Wirkung von Chitosan 85/15/A1 kann somit auf das Lösungsmittel Essigsäure zurückgeführt werden.

Fujimoto et al. (2006) schreiben dem Lösungsmittel die höchste Bedeutung zu. Ihrer Meinung nach wird der größte Anteil der antibakteriellen Wirkung von Chitosanlösungen durch das Lösungsmittel (organische Säure) verursacht. Die Ergebnisse für Chitosan 1130 und Chitosan-HCl widersprechen dieser Aussage. Beide Substanzen erzielten eine bakterizide Wirkung auf *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia coli* 35218. Sie wurden in 0,01 M PBS gelöst, organische Säuren wurden nicht verwendet (siehe 4.7.1). Die antibakterielle Wirkung der genannten Chitosane steht somit in keinem Zusammenhang mit dem Lösungsmittel. Es ist jedoch vorstellbar, dass durch Kombination mit einer organischen Säure (z.B. Essigsäure) die bakterizide Wirkung gesteigert werden kann.

Neben dem pH-Wert und dem Lösungsmittel können weitere abiotische Faktoren wie Ionenstärke und Anwesenheit von Metallionen die Wirkung von Chitosanen modifizieren. Chung et al. (2003) konnten durch Erhöhung der NaCl-Konzentration eine verbesserte Wirkung von Chitosan erzielen. Sie begründeten ihre Ergebnisse mit der gesteigerten Löslichkeit der Substanzen bei entsprechender Ionenstärke. Tsai und Su (1999) beobachteten hingegen eine verminderte Wachstumshemmung von *Escherichia coli* bei hohen Konzentrationen von Natriumionen. Metallionen (Mg^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+}) können sich an Chitosane binden und deren antibakterielle Wirkung behindern (Tsai und Su 1999, Chung et al. 2003). Die Faktoren Ionenstärke und Metallionen haben im Vergleich nur eine untergeordnete Bedeutung. Der Einfluss von Lösungsmittel und pH-Wert auf die Eigenschaften von Chitosanen ist wesentlich höher zu bewerten. Die widersprüchlichen Ergebnisse im Bezug auf die Ionenkonzentration lassen keine abschließende Bewertung zu. Wahrscheinlich spielt hier der unterschiedliche Versuchsaufbau in den Studien eine entscheidende Rolle.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die antibakterielle Wirkung von Chitosanderivaten in erheblichem Umfang durch die Molekularstruktur beeinflusst wird. Das Molekulargewicht nimmt hierbei den höchsten Stellenwert ein. Die besten Eigenschaften zeigen Substanzen mit einem mittleren Molekulargewicht, sehr große Moleküle erzielen hingegen schwächere Ergebnisse. Oligomere verursachen lediglich eine geringe Wachstumshemmung der Mikroorganismen, N-Acetyl-D-Glucosamin ist nahezu wirkungslos. Ein hoher Deacetylierungsgrad kann ebenfalls die Aktivität von Chitosanen steigern, da entsprechend mehr positive Ladungen im Molekül vorhanden sind.

Chitosane erzielen im sauren Milieu eine stärkere Wirkung, ein niedriger pH-Wert kann daher die Wachstumshemmung von Bakterien fördern. Organische Säuren stellen ein gutes Lösungsmittel für Chitosane dar, zum einen fungieren sie als Protonendonator und zum

anderen entwickeln sie einen bakteriziden Effekt. Andere Einflussfaktoren (Ionenstärke, Metallionen) sind von untergeordneter Bedeutung.

6.2 Wirkungsmechanismus von Chitosanen

Der exakte Mechanismus der antibakteriellen Wirkung von Chitosanen konnte bisher noch nicht endgültig aufgeklärt werden. Es ist jedoch bekannt, dass er in direktem Zusammenhang mit der kationischen Struktur der Polymere steht (Rabea et al. 2003, Chung et al. 2003).

Helander et al. (2001) untersuchten den Einfluss von Chitosanen auf verschiedene gram-negative Bakterien, unter anderem auf *Escherichia coli*. Sie verwendeten niedrige Konzentrationen: 250 ppm (0,025 %) und 100 ppm (0,01 %). Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnten sie Veränderungen der äußeren Membran von *Escherichia coli* darstellen. Vesikuläre Strukturen und aufgelagertes Material ließen diese Schicht verdickt erscheinen. Die Zellmembran wurde hingegen nicht beeinflusst. Sie fanden weiterhin eine erhöhte Aufnahme von NPN durch die Bakterien unter dem Einfluss von Chitosan. Diese hydrophobe Substanz ist normalerweise nicht in der Lage die äußere Membran gram-negativer Bakterien zu passieren. Auch wurde die Sensibilität der Bakterien gegenüber anionischen Substanzen (z.B. SDS) und Gallensäuren durch Chitosan erhöht. Alle genannten Effekte waren reversibel. In diesen niedrigen Konzentrationen erzielt Chitosan somit vornehmlich seine Wirkung an der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien. Andere Zellbestandteile werden nicht beeinflusst. Liu et al. (2004) erzielten in ihrer Studie ähnliche Ergebnisse. Sie verwendeten deutlich höhere Chitosankonzentrationen (0,25 % und 0,5%) als Helander et al. (2001). Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung, behandelter *Escherichia coli*-Bakterien, wurden zerstörte äußere Membranen und Chitosanauflagerungen gefunden. Die innere Zellmembran erschien unauffällig und war in ihrer Kontinuität vollständig erhalten. Es konnte jedoch die Freisetzung von β -Galactosidase, einem intrazellulär vorkommenden Enzyms, deutlich erhöht werden. Dies zeigt, dass die Permeabilität der inneren Zellmembran durch die verwendeten Chitosanlösungen gesteigert wurde. Inkubation mit einer 1%-igen Chitosanlösung führte zu Perforationen des gesamten Membrankomplex von *Klebsiella pneumoniae* (Didenko et al. 2005). Die Bakterienzellen setzten Zytoplasma frei, die erzielten Effekte waren irreversibel.

Chitosane sind anscheinend in der Lage sich an die Oberfläche von gramnegativen Bakterien zu binden. In niedrigen Konzentrationen erhöhen sie hier nur die Permeabilität der Membranen, dieser Vorgang ist reversibel. Mit steigender Konzentration werden dann Defekte in den Membranen gebildet. Mit Verlust dieser Diffusionsbarriere und der

Freisetzung von Zytoplasma ist die Bakterienzelle nicht mehr überlebensfähig. Dieser Zustand ist irreversibel, eine bakterizide Wirkung wird erzielt.

Bei grampositiven Bakterien scheint Chitosan die Zellwand zu schädigen. Inkubation mit einer 1%-igen Chitosanlösung führte zur vollständigen Zerstörung der Zellwand von *Staphylococcus aureus* (Didenko et al. 2005). Zusätzlich konnten Defekte in der Zellmembran elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden, die Bakterien setzten Zytoplasma frei. Niedrigere Chitosankonzentrationen (0,25 %, 0,5 %) beeinflussen vor allem Zellen, die sich im Teilungsprozess befinden (Liu et al. 2004). Neu gebildete grampositive Bakterien wiesen eine unregelmäßige Form mit zahlreichen Membran- und Zellwanddefekten auf. *Staphylococcus aureus*-Zellen, die sich außerhalb des Teilungsprozesses befanden, wurden hingegen kaum geschädigt. Es ist daher anzunehmen, dass grampositive Bakterien insbesondere während der Zellteilung durch Chitosane beeinflusst werden.

Die in den oben genannten Studien verwendeten Chitosane unterschieden sich hinsichtlich des Molekulargewichts bei ähnlichem Deacetylierungsgrad. Sie lagen aber alle in einem vergleichbaren Bereich zu Chitosan 1130, Chitosan-HCl und Chitosan 85/15/A1. Der präsentierte Mechanismus der Wirkung von Chitosan kann daher auf die Ergebnisse dieser Arbeit übertragen werden. Chitosan 1130 und Chitosan-HCl erzielten in hohen Konzentrationen ebenfalls eine irreversible Wirkung auf die verwendeten Bakterien. In niedrigen Dosen wurde keine vollständige Hemmung der Keime beobachtet, die erzielten Effekte waren reversibel.

Es ist jedoch letztendlich nicht geklärt, wie die genaue Reaktion zwischen kationischem Chitosan und Lipid-Doppelmembran abläuft. Einen theoretischen Ansatz liefern Mecke et al. (2005). Sie untersuchten den Einfluss von polykationischen Polymeren (Polyamidoamine) auf künstlich hergestellte Lipid-Doppelmembranen (DMPC-Membranen). In diesem Modellversuch konnte gezeigt werden, dass die kationischen Makromoleküle Lipide aus den Membranen herauslösen. Entscheidend für die Wirkung der einzelnen Polymere waren das Molekulargewicht und die Ladung. Kleine Molekülgrößen und neutral geladene Polymere mit Acetamidgruppen erzielten eine deutlich schwächere Wirkung. Da verschiedene kationische Moleküle in gleicher Weise Membranen zerstören können, gehen Mecke et al. (2005) von einem generellen Mechanismus aus. Ihrer Meinung nach binden sich die kationischen Gruppen der Makromoleküle an die hydrophilen Bereiche der Membranlipide. Dabei werden energetisch günstige Vesikel gebildet, die mit Polymeren gefüllt sind. Diese werden von einer Doppelmembran umhüllt. Natürliche Membranen sind komplexer aufgebaut als künstliche Lipid-Doppelmembranen, sie enthalten Proteine und zahlreiche Kohlenhydratreste.

Bakterienzellen besitzen zusätzlich zumeist eine Kapsel. Es wäre trotzdem denkbar, dass die antibakterielle Wirkung von kationischen Chitosanen auf einem ähnlichen Mechanismus, wie in diesem Modellversuch dargestellt, beruht.

Ein Großteil der antimikrobiellen Peptide der Haut (z.B. humane- β -Defensine) besitzen ebenfalls kationische Eigenschaften (Schröder 2002). Ihr breites antibakterielles Wirkungsspektrum lässt ebenfalls einen unspezifischen Mechanismus vermuten. Es wird diskutiert, dass sie sich zunächst an negativ geladene Bakterienplasmamembranen binden und dort Aggregate bilden, die einen Hohlraum begrenzen (Schröder 2002). Diese Hohlräume stellen strukturell Poren von definierter Größe dar, welche einen Wasser- und Ionentransport durch die Bakterienmembran ermöglichen. Zusätzlich sind sie in der Lage, die Zellwand von *Staphylococcus aureus* zu schädigen (Schröder 2002). Chitosane können ebenfalls bereits in niedrigen Konzentrationen (0,01 % bis 0,025 %) die Permeabilität von Bakterienmembranen erhöhen (Helander et al. 2001). Es ist somit vorstellbar, dass sie in ähnlicher Weise wie β -Defensine Poren in der Plasmamembran von Mikroorganismen erzeugen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der exakte Mechanismus der antibakteriellen Wirkung von Chitosan nicht vollständig aufgeklärt ist. Es ist jedoch anzunehmen, dass eine unspezifische Reaktion zugrunde liegt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Chitosane eine bakterizide Wirkung auf *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* erzielen können. Konzentrationen von 0,1 % bis 0,5 % von Chitosan 1130 und Chitosan-HCl führten zu einer vollständigen Abtötung beider Keime. Obwohl beide Mikroorganismen unterschiedlich aufgebaut sind, zeigten sie eine ähnliche Empfindlichkeit gegen die verwendeten Chitosanderivate. Andere Studien konnten eine Hemmung von verschiedensten Bakterien, z.B. *Klebsiella pneumonia* (Didenko et al. 2005), *Streptococcus faecalis* (Chung et al. 2004), *Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *Lactobacillus plantarium* (No et al. 2002), *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella typhimurium* (Helander et al. 2001, Chung et al. 2004), durch Chitosane nachweisen. Es ist daher nahe liegend, dass Chitosane universal vorkommende Zellstrukturen schädigen. Eine Zerstörung von Bakterienplasmamembran und Zellwand - mit Verlust der selektiven Permeabilität - scheint für die antibakterielle Wirkung von Chitosanen verantwortlich zu sein. Andere Mechanismen, wie die Bindung von metallischen Spurenelementen in Chelatkomplexen und Inhibition von Enzymen durch Chitosan, können unterstützend wirken (Rabea et al. 2003).

6.3 Einsatz der Lasernephelometrie zum Wachstumsmonitoring von Mikroorganismen

Die klassischen Anwendungen der Nephelometrie sind die Bestimmung von verschiedenen Protein- und Antigen-Antikörper-Präzipitaten (Döner 2001, Haeckel und Schumann 1995). Auch können Löslichkeitstests von pharmazeutischen Produkten mit Hilfe der Nephelometrie durchgeführt werden (Bevan und Lloyd 2000). Eine hingegen wenig genutzte Anwendungsmöglichkeit ist das Wachstumsmonitoring von Mikroorganismen.

Für diese Arbeit wurde ein Lasernephelometer auf der Basis von Mikrotiterplatten verwendet. Das Gerät wurde mit einer 96-Well-Platte bestückt. Es konnten daher bereits in einem Messgang verschiedenste Konzentrationsstufen getestet werden.

Ebenfalls vorteilhaft ist, dass mit Hilfe des Nephelometers ein Verlauf des Bakterienwachstums aufgezeichnet werden kann. Durch stündliche Bestimmung der Trübung in den Proben, kann die Vermehrung der Bakterien exakt kontrolliert werden. Die einzelnen Phasen des Wachstums (Anlaufphase, exponentieller Anstieg und stationäre Phase) lassen sich mit dieser Methode genau darstellen.

Die erzielten Messwerte waren reproduzierbar. In dieser Arbeit wurden jeweils 16 Einzelwerte pro Konzentration ermittelt und statistisch ausgewertet (siehe 4.8). Die Verteilung der Einzelwerte zeigte die höchsten Streuungen in der Phase des Anstiegs. Dies lässt sich damit erklären, dass das Wachstum in den Proben nicht exakt zum gleichen Zeitpunkt startete. Im weiteren Verlauf der Messungen näherten sich die Einzelwerte einander an. Fouda et al. (2006) untersuchten den Einfluss von β -Cyclodextrin-Komplexen mit fungiziden Econazol-Nitrat bzw. Ciclopirox-olamine auf *Candida albicans* und *Candida krusei* mit Hilfe der Lasernephelometrie. Sie berichten ebenfalls von einer guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Hipler et al. (2003) führten Vergleichsmessungen im Photometer und im Nephelometer durch. Grundsätzlich waren beide Methoden hierbei ebenbürtig. Im Bezug auf die Sensitivität, erzielte die Nephelometrie jedoch bessere Ergebnisse. Mithilfe der Lasernephelometrie ist es möglich geringe Partikelkonzentrationen nachzuweisen. Es können somit bereits geringfügige Änderungen der Bakterienzahl in den Proben erfasst werden. Gegenüber klassischen Verfahren der Empfindlichkeitstestung von Mikroorganismen, wie Reihenverdünnungstest oder Agardiffusionstest, hat die Nephelometrie somit Vorteile im Bereich niedriger Bakterienzahlen. Es kann bereits in der Anfangsphase des Wachstums gemessen werden. Dieser Zugewinn an Information, durch die höhere Sensitivität der Lasernephelometrie, kann bei wissenschaftlichen Arbeiten vorteilhaft sein. Im Bereich klinischer Anwendungen (z.B. Antibiotogramm) sind diese zusätzlichen Daten aber eher von untergeordneter Bedeutung.

Durch die hohe Empfindlichkeit des Nephelometers besteht die Gefahr der Verfälschung von Messwerten durch Artefakte. Partikel, die sich während der Messungen bilden, können falsch positive Werte erzeugen. Es ist denkbar, dass das Ausfallen von Chitosanen aus der Lösung zu einer Erhöhung der Messwerte führen kann. Auch die Verdunstung von Wasser und Kondensation an der semipermeablen Abdeckfolie kann zu einer Erhöhung der Lichtstreuung führen. Es ist anzunehmen, dass diese störenden Prozesse teilweise die Streuung der Messwerte verursachten. In diesem Zusammenhang ist auch auf die Notwendigkeit der Verwendung von Blanks (Leerwerten) hinzuweisen. Nährmedium und Chitosanlösungen verursachen ebenfalls Trübungen, die von den Messwerten abgezogen werden müssen. Andernfalls erhält man fehlerhafte Daten.

Die Lasernephelometrie stellt somit eine gut geeignete Methode für das Monitoring von Mikroorganismen dar. Sie erzielt reproduzierbare Ergebnisse mit hoher Sensitivität. Durch Korrektur der Messwerte um die entsprechenden Blanks lassen sich mögliche Fehlerquellen minimieren.

7 Schlussfolgerungen

Chitosane erzielen, in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht und Deacetylierungsgrad, eine bakterizide Wirkung auf verschiedenste gramnegative und grampositive Bakterien. Am effektivsten sind Substanzen mit einem mittleren Molekulargewicht und hohem Deacetylierungsgrad. In der vorliegenden Arbeit konnte eine vollständige Abtötung von *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und *Escherichia coli* 35218 durch Chitosan 1130 und Chitosan-HCl beobachtet werden. Andere Studien konnten eine Hemmung von unterschiedlichsten Bakterien nachweisen. Dieses breite antibakterielle Spektrum und der zugrunde liegende unspezifische Wirkungsmechanismus machen Chitosan zu einer interessanten Substanz im Bereich medizinischer Anwendungen. Vornehmlich ist hier an eine lokale Anwendung zu denken. Chitosane könnten in antimikrobiellen Salben oder Wundverbänden Verwendung finden. Chitosane zeigen im sauren Bereich ihr Wirkungsmaximum. Die Hautoberfläche hat einen pH-Wert von 5,5 (Rassner 2002). Eine dermale Anwendung der Substanzen wäre dementsprechend vorstellbar.

Aufgrund ihres unspezifischen Wirkungsmechanismus, ist ein Einsatz von Chitosanen gegen Bakterienstämme mit Antibiotikaresistenzen (z.B. MRSA) denkbar. Ihre Wirksamkeit gegen diese Problemkeime wurde bisher noch nicht untersucht. Weiterführende wissenschaftliche Arbeiten in diesem Bereich wären wünschenswert.

Auch könnten kosmetische Artikel wie etwa Zahncreme oder Mundspüllösungen mit Chitosanen versehen werden. Eine weitere interessante Möglichkeit der Verwendung ist die Herstellung von antibakteriellen Fasern und bioaktiven Textilien. Chitosanmoleküle können an Cellulosefasern gebunden werden (Rahbaran et al. 2006). Diese neuartigen bioaktiven Fasern werden bisher nur zu experimentellen Zwecken eingesetzt und sind noch nicht kommerziell erhältlich. In Zukunft ist aber eine Verwendung im Bereich von Hygieneartikeln oder Medizinprodukten denkbar. Bei diesen Anwendungen muss eine Mischflora aus verschiedenen Bakterien und Pilzen gehemmt werden. Das breite antimikrobielle Spektrum von Chitosanen, welches Bakterien als auch verschiedene Pilze einschließt, ist in diesem Zusammenhang von entscheidender Bedeutung.

Chitosane werden aus Chitin gewonnen, welches als häufig vorkommendes Polysaccharid ein billiges Rohmaterial darstellt. Chitin fällt zum Beispiel als Nebenprodukt in der Lebensmittelindustrie an. Chitosane können dann relativ einfach aus Chitin hergestellt werden (siehe 2.1). Die Verwendung von Chitosan als antimikrobielle Substanz ist daher auch aus ökonomischer Sicht interessant.

Die antibakterielle Wirkung von Chitosanen, in Abhängigkeit von verschiedensten Einflussfaktoren, konnte in dieser Arbeit und anderen Studien gezeigt werden. Es steht somit eine ausreichende Datenmenge an in vitro Untersuchungen zur Verfügung. Im Gegensatz hierzu fehlen jedoch zurzeit noch klinische Studien. Die vorhandenen Ergebnisse können daher nur als Grundlage für weiterführende klinische Untersuchungen gesehen werden.

Zum heutigen Zeitpunkt ist noch nicht geklärt, in welchem Ausmaß Chitosane eine Wirkung auf humane Zellen haben. Grundsätzlich gelten Chitinderivate als biokompatibel und nicht toxisch. In vitro Studien erzielten jedoch gegensätzliche Ergebnisse, die von proliferationsfördernden (Howling et al. 2001) bis wachstumshemmenden Effekten (Mori et al. 1997) reichen. Die Wirkung zeigte eine Abhängigkeit von der verwendeten Zellart. Chitosane können die Bildung von Interleukin-8 induzieren (Mori et al. 1997), Makrophagen aktivieren sowie die Angiogenese stimulieren (Muzzarelli 1997). Neben den in der vorliegenden Arbeit aufgeführten antibakteriellen Eigenschaften von Chitosan ist eine Beeinflussung von Wundheilungsprozessen wahrscheinlich. Vor einer Anwendung von Chitosan als antibakterieller Wirkstoff muss eine Schädigung von humanen Zellen ausgeschlossen werden. Hierzu sind weitere Untersuchungen nötig.

Chitosane sind aufgrund ihrer Molekularstruktur im sauren pH-Bereich gut wasserlöslich. Bei hohen pH-Werten verschlechtert sich ihre Löslichkeit hingegen deutlich. Die antimikrobielle Wirkung vermindert sich entsprechend stark im basischen Bereich. Durch diese chemischen Eigenschaften werden die Einsatzmöglichkeiten von Chitosanen limitiert. Die Synthese von Derivaten mit verbesserter Wasserlöslichkeit könnte die Anwendbarkeit von Chitosanen verbessern. Es existieren einige interessante Ansätze in diesem Bereich. Chemische Modifikation, insbesondere das Einfügen von zusätzlichen funktionellen Gruppen (z.B. Hydroxypropyl-, Dimethylaminoethyl-Gruppen) (Peng et al. 2005, Je und Kim 2006) oder die Bindung von verschiedenen Disacchariden (Yang et al. 2002), konnten die Löslichkeit deutlich steigern. Leider zeigten diese modifizierten Derivate in den meisten Fällen verminderte antimikrobielle Eigenschaften gegenüber nativen Chitosan. Gleichwohl könnte die Weiterentwicklung von Chitosanderivaten mit verbesserten Eigenschaften die Anwendung der Substanzen in Zukunft erleichtern.

8 Literaturverzeichnis

Bevan CD, Lloyd RS. 2000. A high-throughput screening method for the determination of aqueous drug solubility using laser nephelometry in microtiter plates. *Anal Chem*, 72(8):1781-1787.

Chandy T, Sharma CP. 1990. Chitosan-as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif Organs*, 18(1):1-24.

Chen YM, Chung YC, Wang LW, Chen KT, Li SY. 2002. Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 37(7):1379-1390.

Chung YC, Wang HL, Chen YM, Li SL. 2003. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresour Technol*, 88(3):179-184

Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JC, Lin JG. 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin*, 25(7):932-936.

Didenko LV, Gerasimenko DV, Konstantinova ND, Silkina TA, Avdienko ID, Bannikova GE, Varlamov VP. 2005. Ultrastructural Study of Chitosan Effects on Klebsiella and Staphylococci. *Bull Exp Biol Med*, 140(3):356-360.

Dodane V, Amin Khan M, Merwin JR. 1999. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm*, 182(1):21-32.

Dörner K, Hrsg. 2001. *Klinische Chemie und Hämatologie*. Vierte Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 34-35

Felt O, Buri P, Gurny R. 1998. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*, 24(11):979-993.

Fouda MM, Knittel D, Hipler UC, Elsner P, Schollmeyer E. 2006. Antimycotic influence of β -cyclodextrin complexes-in vitro measurements using laser nephelometry in microtiter plates. *Int J Pharm*, 311(1-2):113-121.

Fujimoto T, Tsuchiya Y, Terao M, Nakamura K, Yamamoto M. 2006. Antibacterial effects of chitosan solution against *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*, 112(2):96-101.

Haeckel R, Schumann G. 1995. Methoden der Meßwerterfassung (Meßmethoden). In: Greiling H, Gressner AM, Hrsg. *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*. Dritte Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer, 120-141.

Hahn H, Miksits K, Gattermann S. 2005. Staphylokokken. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Fünfte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin-Verlag, 187-198.

Hahn H, Bockemühl J. 2005. Enterobakterien. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Fünfte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin-Verlag, 236-248.

Heesemann J. 2001. Die Familie der Enterobacteriaceae. In: Köhler W, Eggers H, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie*. Achte Aufl. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 303-310.

Helander IM, Nurmiäho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol*, 71(2-3):235-244.

Hipler B, Brand S, Angersbach S, Rückert C. 2003. Monitoring des Wachstums von Mikroorganismen mit Hilfe der Nephelometrie. *Biospektrum*, 5:648-649

Hirano S. 1996. Chitin biotechnology applications. *Biotechnol Annu Rev*, 2:237-258.

Hofmann H. 1995. Bakterielle Erkrankungen. In: Jung EG, Hrsg. Dermatologie. Dritte Aufl. Stuttgart: Hippokrates Verlag, 141-159

Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ. 2001. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*, 22(22):2959-2966.

Iida J, Une T, Ishihara C, Nishimura K, Tokura S, Mizukoshi N, Azuma I. 1987. Stimulation of non-specific host resistance against Sendai virus and *Escherichia coli* infections by chitin derivatives in mice. *Vaccine*, 5(4):270-274.

Illum L, Farraj NF, Davis SS. 1994. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm Res*, 11(8):1186-1189.

Illum L. 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res*, 15(9):1326-1331.

Je JY, Kim SK. 2006. Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane. *J Agric Food Chem*, 54(18):6629-6633.

Jumaa M, Furkert FH, Müller BW. 2002. A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. *Eur J Pharm Biopharm*, 53(1):115-123.

Kittur FS, Vishu Kumar AB, Varadaraj MC, Tharanathan RN. 2005. Chitoooligosaccharides--preparation with the aid of pectinase isozyme from *Aspergillus niger* and their antibacterial activity. *Carbohydr Res*, 340(6):1239-1245.

Kumar BA, Varadaraj MC, Tharanathan RN. 2007. Low molecular weight chitosan--preparation with the aid of pepsin, characterization, and its bactericidal activity. *Biomacromolecules*, 8(2):566-572.

Lim SH, Hudson SM. 2004. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. *Carbohydr Res*, 339(2):313-319.

Liu H, Du Y, Wang X, Sun L. 2004. Chitosan kills bacteria through cell membran damage. *Int J Food Microbiol*, 95 (2):147-155.

Luessen HL, de Leeuw BJ, Langemeyer MW, de Boer AB, Verhoef JC, Junginger HE. 1996. Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug buserelin in vivo. *Pharm Res*, 13(11):1668-1672.

Maezaki Y, Tsuji K, Nakagawa Y, Kawai Y, Akimoto M, Tsugita T, Takekawa W, Terada A, Hara H, Mitsuoka T. 1993. Hypcholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci Biotech Biochem*, 57(9):1439-1444.

Mecke A, Majoros IJ, Patri AK, Baker JR Jr, Holl MM, Orr BG. 2005. Lipid bilayer disruption by polycationic polymers: the roles of size and chemical functionel group. *Langmuir*, 21(23):10348-10354.

Mori T, Okumura M, Matsuura M, Ueno K, Tokura S, Okamoto Y, Minami S, Fujinaga T. 1997. Effects of chitin and its derivates on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 18(13):947-951.

Muzzarelli RA. 1997. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Mol Life Sci*, 53(2):131-140.

Nishimura K, Nishimura S, Nishi N, Numata F, Tone Y, Tokura S, Azuma I. 1985. Adjuvant activity of chitin derivatives in mice and guinea-pigs. *Vaccine*, 3(5):379-384.

Nishimura K, Ishihara C, Ukei S, Tokura S, Azuma I. 1986. Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. *Vaccine*, 4(3):151-156.

No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol*, 74(1-2):65-72.

Okamura Y, Nomura A, Minami S, Okamoto Y. 2005. Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on release of type I collagenase from fibroblasts. *Biomacromolecules*, 6(5):2382-2384.

Peng Y, Han B, Liu W, Xu X. 2005. Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan. *Carbohydr Res*, 340(11):1846-1851.

Peters G, Pulverer G. 2001. Die Familie der Micrococcaceae. In: Köhler W, Eggers H, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie*. Achte Aufl. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 250-257.

Ph Eur. 2005. Chitosanhydrochlorid. In: *Europäisches Arzneibuch*. Fünfte Aufl. Stuttgart: Deutscher Apothekerverlag, 1728-1729.

Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smaghe G, Steuerbaut W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6):1457-1465.

Rao SB, Sharma CP. 1997. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res*, 34(1):21-28.

Rahbaran S, Redlinger S, Einzmann M. 2006. New bioactive cellulosic fibers. *Chemical Fibers International*, 2: 98-102

Rassner G, Hrsg. 2002. *Dermatologie Lehrbuch und Atlas*. Siebte Aufl. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 5-9.

Rhoades J, Roller S. 2000. Antimicrobial Actions of Degraded and Native Chitosan against Spoilage Organisms in Laboratory Media and Foods. *Appl Environ Microbiol*, 66(1): 80-86.

Schipper NG, Varum KM, Artursson P. 1996. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm Res*, 13(11):1686-1692.

Schröder JM. 2002. Antimikrobielle Peptide: Effektormoleküle der Haut als Abwehrorgan. *Der Hautarzt*, 53(6):424-435.

Singla AK, Chawla M. 2001. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects an update. *J Pharm Pharmacol*, 53(8):1047-1067.

Strand SP, Vandvik MS, Varum KM, Ostgaard K. 2001. Screening of Chitosans and Conditions for Bacterial Flocculation. *Biomacromolecules*, 2(1):126-133.

Tanaka Y, Tanioka S, Tanaka M, Tanigawa T, Kitamura Y, Minami S, Okamoto Y, Miyashita M, Nanno M. 1997. Effects of chitin and chitosan particles on BALB/c mice by oral and parenteral administration. *Biomaterials*, 18(8):591-595.

Tsai GJ, Su WH. 1999. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J Food Prot*, 62(3):239-243.

Tsai GJ, Wu ZY, Su WH. 2000. Antibacterial activity of a chitooligosacchride mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. *J Food Prot*, 63(6):747-752.

Tsai GJ, Zhang SL, Shieh PL. 2004. Antimicrobial activity of a low-molecular-weight chitosan obtained from cellulase digestion of chitosan. *J Food Prot*, 67(2):396-398.

Wintermantel E, Ha SW, Hrsg. 2002. *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*. Dritte Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 196-197.

Yang TC, Chou CC, Li CF. 2005. Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. *Int J Food Microbiol*, 97(3):237-245.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Strukturformel von Chitosan.....	3
Abbildung 2.2: Deacetylierung von Chitin zu Chitosan	4
Abbildung 2.3: Mikroplattenephelometer „NEPHELOstar Galaxy“.....	11
Abbildung 2.4: Laser.....	11
Abbildung 4.1: Chitosan 1130	15
Abbildung 4.2: Chitosan-HCl	15
Abbildung 4.3: Chitosan 85/15/A1	16
Abbildung 4.4: Chitosan-oligosaccharid-lactat.....	17
Abbildung 4.5: N-Acetyl-D-Glucosamin.....	17
Abbildung 4.6: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (links) und <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 (rechts) auf Mueller-Hinton Sang Mouton Agarplatten nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C	18
Abbildung 5.1: Standardkurve für <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	30
Abbildung 5.2: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 ohne Chitosan.....	31
Abbildung 5.3: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 ohne Chitosan.....	31
Abbildung 5.4: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit Chitosan 1130	33
Abbildung 5.5: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit Chitosan 1130, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts).....	34
Abbildung 5.6: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit Chitosan 1130	35
Abbildung 5.7: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit Chitosan 1130, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts).....	36
Abbildung 5.8: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit Chitosan-HCl	37

Abbildung 5.9: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit Chitosan-HCl, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts).....	38
Abbildung 5.10: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit Chitosan-HCl	39
Abbildung 5.11: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit Chitosan-HCl, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts).....	40
Abbildung 5.12: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit Chitosan 85/15/A1	41
Abbildung 5.13: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit Chitosan 85/15/A1, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts).....	42
Abbildung 5.14: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit Chitosan 85/15/A1	43
Abbildung 5.15: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit Chitosan 85/15/A1, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts).....	44
Abbildung 5.16: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit Essigsäure	46
Abbildung 5.17: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit Essigsäure	46
Abbildung 5.18: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit Chitosan-oligosaccharid-lactat....	47
Abbildung 5.19: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit Chitosan-oligosaccharid-lactat, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts).....	48
Abbildung 5.20: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit Chitosan-oligosaccharid-lactat	49
Abbildung 5.21: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit Chitosan-oligosaccharid-lactat, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts).....	50
Abbildung 5.22: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit N-Acetyl-D-Glucosamin.....	51

Abbildung 5.23: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit N-Acetyl-D-Glucosamin, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts).....	52
Abbildung 5.24: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit N-Acetyl-D-Glucosamin	53
Abbildung 5.25: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit N-Acetyl-D-Glucosamin, Verteilung der Messwerte nach 4 h (oben links), 6 h (oben rechts), 10 h (unten links) und 20 h (unten rechts).....	54

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Virulenzfaktoren von <i>Staphylococcus aureus</i>	8
Tabelle 2.2: Virulenzfaktoren von <i>Escherichia coli</i>	9
Tabelle 2.3: obligat pathogene <i>Escherichia coli</i>	9
Tabelle 4.1: Schema der Mikrotiterplatte zur Bestimmung der Standardkurven.....	20
Tabelle 4.2: Schema der Mikrotiterplatte, die zur Bestimmung von Wachstumskurven ohne Chitosan verwendet wurde. In Spalte 1 befinden sich Mc Farland-Standards und Aqua dest. als Blank. Die anderen Spalten enthalten Bakteriensuspension und entsprechende Blanks.....	21
Tabelle 4.3: Verdünnungsschema zur Herstellung von verschiedenen Chitosankonzentrationen für Chitosan 1130 und Chitosan-HCL	22
Tabelle 4.4: verwendete Konzentrationen (X) von Chitosan-oligosaccharid-lactat und N-Acetyl-D-Glucosamin	23
Tabelle 4.5: Schema der Mikrotiterplatte, die für die Messreihen mit Chitosan 1130 und Chitosan-HCL verwendet wurde. Es werden die endgültigen Chitosankonzentrationen angegeben. Wells, die Bakteriensuspension enthalten, sind fett umrandet. In Spalte 1 befinden sich Mc Farland-Standards mit ihrem Blank Aqua dest. Alle anderen Wells enthalten Blanks.	25
Tabelle 4.6: Konzentrationen (in %) von Chitosan-oligosaccharid-lactat und N-Acetyl-D-Glucosamin auf der Mikrotiterplatte	25
Tabelle 4.7: Einstellung des Nephelometers (NEPHELOstar Galaxy) für die Messreihen.....	26
Tabelle 5.1: Keimzahlbestimmung für <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	28
Tabelle 5.2: Keimzahlbestimmung für <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	29
Tabelle 5.3: Berechnung der Keimzahlen für verschieden Trübungen (in Mc Farland)	29
Tabelle 5.4: berechnete Werte m und n der Formel $y = m \cdot x + n$	30

Tabelle 5.5: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit Chitosan 1130, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit Puffer), signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt.....	34
Tabelle 5.6: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit Chitosan 1130, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit Puffer), signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt.....	36
Tabelle 5.7: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit Chitosan-HCl, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit Puffer), signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt.....	38
Tabelle 5.8: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit Chitosan-HCl, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit Puffer), signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt.....	40
Tabelle 5.9: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit Chitosan 85/15/A1, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit Puffer), signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt.....	42
Tabelle 5.10: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit Chitosan 85/15/A1, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit Puffer), signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt.....	44
Tabelle 5.11: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit Chitosan-oligosaccharid-lactat, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Kontrolle mit Puffer, signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt.....	48
Tabelle 5.12: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit Chitosan-oligosaccharid-lactat, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Kontrolle mit Puffer, signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt.....	50

Tabelle 5.13: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mit N-Acetyl-D-Glucosamin, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Kontrolle mit Puffer, signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt.....	52
Tabelle 5.14: <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 mit N-Acetyl-D-Glucosamin, Signifikanz p und relativer Anteil in Prozent zur Referenz (Kontrolle mit Puffer), signifikante Werte $p < 0,05$ sind fett gedruckt.....	54
Tabelle 5.15: pH-Werte vor den Messungen.....	55
Tabelle 5.16: pH-Werte nach den Messungen	56

9.3 Arbeitsanweisung Bakterienanzucht

Im Labor der Hautklinik Jena befinden sich 6 verschiedene Bakterienstämme:

- ATCC 29212 *Enterococcus faecalis* (grampositive Kokken)
- ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (grampositive Kokken)
- ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (grampositive Kokken)
- ATCC 35218 *Escherichia coli* (gramnegative Stäbchen)
- ATCC 19404 *Clostridium sporogenes* (grampositive Stäbchen)
- TW 0014 *Escherichia coli* (gramnegative Stäbchen)

Diese sind jeweils zur Aufbewahrung in zwei verschiedenen Tiefkühlschränken eingefroren.

1. Liebherr Tiefkühltruhe -20 Grad Celsius ID 003401 Standort: Raum E046
2. Heraeus Tiefkühlschrank -80 Grad Celsius ID 59853 Standort: Raum 0217

Zum Einfrieren werden folgende Gefäße benutzt: Microbank PRO-LAB DIAGNOSTICS (viva diadnostica , Bestellnummer: Prod.# :PL 160/M)

Entnahme:

Wird ein Bakterienstamm benötigt, so nimmt man das entsprechende Microbankgefäß aus dem Tiefkühlgerät.

Eine kleine Kugel aus dem Gefäß wird aseptisch mit einer sterilen blauen Öse entnommen und auf einer Agarplatte ausgestrichen bzw. in flüssiges Medium überführt.

Agarplatten zur Anzucht der Bakterien:

- | | | |
|------|-----------------------|-----------------------------------|
| | Columbia-Blutagar | OXOID: Art.-Nr. CM 331 + FSR 1055 |
| oder | Columbia-Blutagar SB, | BD: Best.-Nr. 254071 (120 Stück) |
| oder | Mueller-Hinton SB | viva: REF: 251820) |

Bouillon zur Anzucht der Bakterien:

- | | | |
|------|--------------------|----------------------------------|
| | Glucose –Bouillon | OXOID: Art.-Nr. CM 175 |
| oder | Schaedler-Bouillon | BD: Best.-Nr. 221542 (100 Stück) |

Die Agarplatte oder die Flüssigkultur wird bei 37 Grad Celsius im Brutschrank für 24 Stunden aerob bebrütet. Am nächsten Tag sollte die Bakterienkultur auf der Agarplatte in Reinkultur vorlegen. Dann kann man mit dieser weiterarbeiten.

Wiedereinfrieren:

Soll ein Bakterienstamm wieder eingefroren werden, so entnimmt man von einer frischen sauberen Bakterienkultur (junge Kolonien 18 – 24 Stunden alt) ungefähr eine sterile blaue Öse voll Material und reibt diese in das Microbankgefäß ein. Dort wird alles homogen verquirlt und die überstehende Flüssigkeit wird mit einer sterilen Spritze abgesaugt und verworfen. Das Gefäß wird verschlossen und 4-5 mal geschwenkt um zu mischen (nicht vortexen!). Das Röhrchen wird mit einem Dauermarkierer beschriftet und bei –20 Grad Celsius bzw. –80 Grad Celsius eingefroren.

9.4 Arbeitsanweisung Keimzahlbestimmung bei Bakterien

Die Keimzahlbestimmung bei Bakterien erfolgt durch Auszählung einzelner Kolonien auf einer Agarplatte. Zur Auszählung ist eine durchsichtige Platte empfehlenswert. Wir benutzen Mueller Hinton II Agar (Firma Becton Dickinson BD, Bestell-Nr. 254081)

Um beispielsweise die genaue Keimzahl aus dem Ansatz für die Hemmhöfe zu bestimmen benutzt man für beides das gleiche angesetzte Röhrchen. Für die Keimzahlbestimmung muß dieses noch in mehreren Stufen verdünnt werden.

Ansatz:

- 1Röhrchen mit einer Bakterienreinkultur, z.B. Mc Farland 0,1
- Daraus werden folgende Verdünnungen mit 0,9% physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) hergestellt:
1:10 1:100 1:1000 1:10000 1:100000 1:1000000
- Am Beispiel Mc Farland 0,1 sind folgende Verdünnungen auswertbar: 1:1000 1:10000 1:100000. Diese müssen auch nur auf die Platte pipettiert werden. Bei den anderen Verdünnungen sind die Kolonien auf der Agarplatte mengenmäßig nicht mehr zählbar.
- Aus den entsprechenden Verdünnungsröhrchen werden jeweils 100 µL auf eine Müller Hinton II Agarplatte pipettiert. Diese Flüssigkeit wird mit einem Drigalskispatel gleichmäßig auf dem Agar verteilt.
- Die Platte wird für 24 Stunden aerob bei 37 Grad Celsius bebrütet.

Auswertung:

- Am nächsten Tag werden die Kolonien auf den Platten ausgezählt. Die Zählung erfolgt mittels colony counter und mini light box (Firma scienceware , Catalog no. 37864-0000).
- Dabei wird die durchsichtige Agarplatte auf die Lichtplatte gelegt und jede einzelne Kolonie gezählt. Die Anzahl der Kolonien aus den einzelnen Verdünnungen werden notiert und daraus der Mittelwert berechnet.

Beispiel Mc Farland 0,1:

Verdünnung 1:1000	624 Kolonien gezählt = 624000 = 6,24E+05
Verdünnung 1:10000	60 Kolonien gezählt = 600000 = 6,00E+05
Verdünnung 1:100000	6 Kolonien gezählt = 600000 = 6,00E+05

Mittelwert = 6,08E+05

6,08E+05 = KBE (koloniebildende Einheiten) in 100 µL (da 100µL auf die Platte pipettiert wurden)
= 6,08E+05 KBE/100µL
= 6,08E+06 KBE/mL

Ergebnis: Die Keimzahl in diesem Beispiel beträgt 6,08E+06 KBE/mL.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kehr
Vorname: Felix
Geburtsdatum: 18.02.1981
Geburtsort: Erfurt
Familienstand: ledig
Vater: Manfred Sporbert
Geboren: 18.03.1956
Beruf: Modellbauer
Mutter: Jutta Renate Kehr
Geboren: 27.02.1950
Beruf: Innenarchitektin

Schulausbildung

1987-1991 Besuch der Pablo-Neruda-Schule in Erfurt
1991-1999 Besuch des Heinrich-Mann-Gymnasiums in Erfurt
1999 Abschluss der Schulausbildung mit der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

1999-2000 Oktober 1999 - August 2000 in der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Helios Klinikums Erfurt

Studium

2000-2005 Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2005 Abschluss des Studiums im Dezember 2005 mit dem Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

seit April 2006 Arbeit in der Praxis von Dipl.-Stom. Stephan Fritzsche in Dresden

Dresden, 18.06.2008

Felix Kehr

Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an alle, die in unterschiedlicher Weise zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben. Zunächst an meine Eltern für die grundlegende Unterstützung meines akademischen Werdegangs.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. rer. nat. Uta-Christina Hipler für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung, ihre vielen Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit sowie ihren ständigen Ansporn.

Weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Labors der Klinik für Dermatologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena für die Einweisung im Labor und an verschiedensten Geräten. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. habil. Peter Elsner für die Überlassung des Themas.

Mein abschließender Dank geht an Daniela Engelmann für ihre beständige Unterstützung und wissenswerten Ratschläge.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Dr. rer. nat. Uta-Christina Hipler,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Dresden, am 18.06.2008

Felix Kehr, Verfasser